

Université de Montréal

**Relations entre le statut utérin, les paramètres biochimiques du sérum et du liquide de lavage utérin et la production d'embryons chez les vaches laitières après suroovulation**

par

**Hasina Santatriniaina Rasolomboahanginjatovo**

Département de biomédecine vétérinaire

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

maître ès Sciences (**M. Sc.**)

en sciences vétérinaires

option biomédecine

Mars 2011

© Hasina Santatriniaina Rasolomboahanginjatovo, 2011

Université de Montréal  
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

**Relations entre le statut utérin, les paramètres biochimiques du sérum et du liquide de lavage utérin et la production d'embryons chez les vaches laitières après suroovulation**

présenté par

**Hasina Santatriniaina Rasolomboahanginjatovo**

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

**Dr Christopher A. Price**, président-rapporteur

**Dr Younès Chorfi**, directeur de recherche

**Dr Réjean C. Lefebvre**, codirecteur

**Dr Jocelyn Dubuc**, membre du jury

## RÉSUMÉ

Le développement et la survie de l'embryon dépendent des nutriments fournis par les sécrétions utérines. Les objectifs de cette étude étaient de déterminer l'effet de la suroovulation (SOV) sur la bactériologie et cytologie utérine et sur les paramètres biochimiques utérin et sérique et leurs effets sur le nombre d'embryons transférables (ET). Deux groupes de vaches Holstein (groupe I, non lactante, n=7 et groupe II, lactante, n=28) ont été respectivement induites en chaleur ou surovulées et ensuite inséminées. Au jour 7 du cycle œstral (J7) et lors du jour de la récolte (JR), un prélèvement individuel de sang et de liquide de lavage utérin a été fait pour l'analyse du statut bactériologique et cytologique de l'utérus et la mesure de la concentration de plusieurs paramètres biochimiques présélectionnés. Les embryons récoltés ont été évalués selon les critères de l'IETS. La SOV a donnée une moyenne de  $7.39 \pm 6.22$  ovocytes/embryons dont  $3.32 \pm 4.81$  ET. Il n'y avait pas de variation significative de la bactériologie et cytologie utérine des deux groupes entre J7 et JR. La concentration sérique de l'urée ( $P=0.0001$ ), d'E2 ( $P=0.006$ ); la concentration utérine du Glu ( $P=0.002$ ), de Ck ( $p=0.0007$ ), de LDH ( $P < 0.0001$ ), de PT ( $P=0.004$ ), de P4 ( $P=0.008$ ), de PGFM ( $P < 0.0001$ ) du groupe I et la concentration sérique de P4 ( $P < 0.0001$ ), de PGFM ( $P < 0.0001$ ); la concentration utérine de LDH ( $P=0.002$ ), de PGFM ( $P < 0.0001$ ) du groupe II ont été significativement élevées à JR qu'à J7. La concentration utérine et sérique de l'urée ( $P < 0.0001$  et  $P < 0.0001$ ), de LDH ( $P < 0.0001$  et  $P=0.008$ ), la concentration sérique de P4 ( $P=0.0002$ ) et la concentration utérine de PT ( $P=0.0003$ ) à JR du groupe II étaient différentes du groupe I. Il n'y avait pas d'association entre la bactériologie et cytologie utérine et le nombre d'ET. Cependant, le nombre d'ET a été positivement corrélé avec la concentration sérique d'IGF-1 à J7 ( $r=0.45$ ;  $P=0.001$ ) et la concentration sérique de P4 à JR ( $r=0.43$ ;  $P < 0.05$ ) et négativement corrélé avec la concentration utérine et sérique de PGFM à la fois à J7 ( $r=-0.54$ ;  $P < 0.005$  et  $r=-0.67$ ;  $P < 0.001$ ) et à JR ( $r=-0.48$ ;  $P < 0.01$  et  $r=-0.57$ ;  $P < 0.002$ ). Ces résultats suggèrent que la SOV induit des changements au niveau sérique et utérin qui affectent le nombre d'ET récoltés.

**Mots-clés :** Surovulation, Paramètre biochimique utérin et sérique, Bactériologie et cytologie utérine, Embryon transférable, Vache laitière Holstein

## ABSTRACT

The developing embryo is dependent on the nutrients provided by the oviduct and the uterine fluid. The objectives of this study were to determine the effect of SOV on uterine bacteriology and cytology, on serum and uterine biochemical parameters and consequently on the number of TE. Non-lactating (n=7) and lactating (n=28) Holstein cows were synchronized for estrus and superovulated respectively and were inseminated twice. Uterine bacteriology and cytology and various uterine and serum biochemical parameters were measured at day 7 of estrus cycle (D7, starting day of the SOV protocol) and at the designated day of embryo recovery (DER). Harvested embryos were evaluated according to IETS's criteria. Superovulated cows produced an average of  $7.39 \pm 6.22$  ova/embryos of which  $3.32 \pm 4.81$  were TE. There were no significant variations of uterine bacteriology and cytology between D7 and DER within the two groups. Serum urea ( $P=0.0001$ ), E2 ( $P=0.006$ ); uterine Glu ( $P=0.002$ ), Ck ( $P=0.0007$ ), LDH ( $P<0.0001$ ), TP ( $P=0.004$ ), P4 ( $P=0.008$ ), PGFM ( $P<0.0001$ ) in group I and serum P4 ( $P<0.0001$ ), PGFM ( $P<0.0001$ ); uterine LDH ( $P=0.002$ ), PGFM ( $P<0.0001$ ) in group II were significantly higher at DER than at D7. At DER, group I was different to group II' uterine and serum urea ( $P<0.0001$  and  $P<0.0001$ ), LDH ( $P<0.0001$  and  $P=0.008$ ), PGFM ( $P=0.002$  and  $P=0.009$ ), serum P4 ( $P=0.0002$ ) and uterine TP ( $P=0.0003$ ). There was no association between uterine bacteriology and cytology and the number of TE. However, TE was positively correlated with serum IGF-1 at D7 ( $r=0.45$ ;  $P=0.001$ ) and P4 at DER ( $r=0.43$ ;  $P<0.05$ ) and negatively correlated with both serum and uterine PGFM respectively at D7 ( $r=-0.54$ ;  $P<0.005$  and  $r=-0.67$ ;  $P<0.001$ ) and DER ( $r=-0.48$ ;  $P<0.01$  and  $r=-0.57$ ;  $P<0.002$ ). The present results infer that changes following SOV in both serum and uterine secretion may affect the number of TE.

**Key words :** Superovulation, Uterine and serum biochemical parameter, Uterine bacteriology and cytology, Transferable embryo, Holstein dairy cow

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	i
ABSTRACT .....	ii
TABLE DES MATIÈRES .....	ii
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	viii
DÉDICACES .....	viii
REMERCIEMENTS.....	viii
INTRODUCTION .....	1
RECENSION DES ÉCRITS.....	3
I.    Physiologie du cycle œstral de la vache.....	3
A.  Phases du cycle œstral.....	3
1.  Jour 0 (J 0) : Œstrus ou chaleur .....	4
2.  J 1 à J 3 : Metœstrus .....	4
3.  J 4 à J 16 : Diœstrus.....	4
4.  J 16 à J 21 : Prœstrus .....	6
B.  Folliculogenèse chez la vache laitière .....	6
1.  Potentiel clinique de la folliculogenèse .....	6
2.  Concept de la folliculogenèse.....	7
3.  Manipulation et application de la folliculogenèse .....	10
II.   Surovulation chez la vache laitière.....	10
A.  Sélection de la vache donneuse .....	11
B.  Procédure de la SOV .....	12
1.  Synchronisation de la vague folliculaire en vue d'une SOV .....	12
2.  Protocole conventionnel de SOV.....	14
C.  Déterminants de la réponse de SOV.....	16
1.  Facteurs intrinsèques à la donneuse.....	16

a.	Âge .....	16
b.	Santé .....	17
c.	Stade du cycle œstral au moment de la SOV .....	18
d.	Variation du temps de maturation des follicules et moment de l'IA.....	19
2.	Facteurs extrinsèques à la donneuse .....	20
a.	Température, saison et environnement.....	20
b.	Nombre de SOV précédentes .....	20
c.	Composition, voies d'administration et doses des gonadotrophines.....	21
d.	Semence.....	22
e.	Nutrition .....	22
f.	Méthode de récolte .....	23
III.	Environnement utérin comme facteur de variation de la réponse à la SOV .....	24
A.	Importance du milieu utérin .....	24
B.	Bactériologie et cytologie du milieu utérin .....	25
C.	Composantes des sécrétions utérines.....	27
1.	Glucose .....	27
2.	Urée.....	28
3.	LDH .....	29
4.	Électrolytes .....	29
a.	Mg .....	30
b.	Na et Cl.....	30
c.	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	30
d.	K et P .....	31
5.	Lipides et acides gras.....	31
6.	Protéines .....	32
7.	Hormones stéroïdiennes.....	32
8.	Prostaglandines (PGE 2 et PGF 2α) .....	33
a.	PGE 2 .....	33
b.	PGF 2α.....	33

9. Facteurs de croissance .....	35
a. Effets de l'IGF-1 sur la croissance folliculaire et la qualité de l'ovocyte ..	35
b. Effets de l'IGF-1 sur le développement de l'embryon .....	36
Hypothèse et objectifs de recherche.....	37
I. Hypothèse .....	37
II. Objectifs .....	37
PRÉSENTATION DE L'ARTICLE .....	38
Abstract .....	39
I. Introduction .....	40
II. Materials and Methods .....	41
A. Animals .....	41
B. Experimental design .....	41
1. Superovulation protocol.....	41
2. Embryo recovery.....	42
3. Embryo handling and evaluation .....	42
4. Blood sampling.....	43
5. Uterine secretion sampling .....	43
6. Uterine bacteriology and cytology assessment.....	43
7. Biochemical analysis .....	44
a. Glu, TP, K, Cl, Na, LDH and urea nitrogen assay .....	44
b. E2 and P4 assay .....	44
c. PGFM assay .....	45
d. IGF-1 assay.....	45
8. Statistical analyses .....	45
III. Results .....	46
A. Superovulation response.....	46
B. Uterine bacteriology and cytology .....	46
C. Uterine and serum biochemical parameters .....	47

IV. Discussion .....	47
V. Acknowledgements .....	52
VI. References .....	52
DISCUSSION GÉNÉRALE .....	68
CONCLUSION GÉNÉRALE .....	74
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	75
ANNEXES .....	xiii
Annexe I : Concentration des paramètres biochimiques, bactériologie et cytologie du groupe I.....	xiii
Annexe II : Concentration des paramètres biochimiques, bactériologie et cytologie du groupe II.....	xv
Annexe III : Concentration d'IGF-1 du groupe II.....	xix



## LISTE DES TABLEAUX

### TABLEAU DANS LA RECENSION DES ÉCRITS

<b>Tableau 1</b> : Bactéries pouvant être isolées dans l’utérus .....	26
---	----

### TABLEAUX DANS L'ARTICLE

<b>Table 1</b> : Composition of total mixed ration .....	65
<b>Table 2</b> : Comparison of biochemical parameter concentrations (mean $\pm$ SEM) measured in serum and uterine lavage in group I at D7 and DER .....	66
<b>Table 3</b> : Comparison of biochemical parameter concentrations (mean $\pm$ SEM) measured in serum and uterine lavage in group II at D7 and DER .....	67

## LISTE DES FIGURES

### FIGURES DANS LA RECENSION DES ÉCRITS

<b>Figure 1</b> : Évènements hormonaux et ovariens du cycle œstral de la vache à 2 vagues folliculaires.....	3
<b>Figure 2</b> : Schéma général des moments de l'émergence des vagues folliculaires durant le cycle œstral .....	8
<b>Figure 3</b> : Profil de la sélection du follicule dominant d'une vache laitière à 2 vagues folliculaires.....	9
<b>Figure 4</b> : Profil de la sélection du follicule dominant d'une vache laitière à 3 vagues folliculaires.....	9
<b>Figure 5</b> : Protocole de SOV utilisant la P4, E2, FSH et PGF 2 $\alpha$ .....	15

## LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

<b>°C :</b>	Degré Celsius
<b>AI :</b>	Artificial insemination
<b>Ck :</b>	Créatine kinase
<b>Cl :</b>	Chlorures
<b>D7 :</b>	Day 7 of estrous cycle
<b>DER :</b>	Day of embryo recovery
<b>DIM :</b>	Days in milk
<b>E2 :</b>	Estradiol 17 $\beta$
<b>eCG :</b>	Equine choronic gonadotrophin
<b>ET :</b>	Embryons transférables
<b>FSH :</b>	Follicle stimulating hormone
<b>Glu :</b>	Glucose
<b>GnRH :</b>	Gonadotrophin releasing-hormone
<b>hMG :</b>	Human menopausal gonadotrophin
<b>IA :</b>	Insémination artificielle
<b>IETS :</b>	International embryo transfer society
<b>IGF-1 :</b>	Insulin-like growth factor 1
<b>im :</b>	Intramuscularly
<b>J :</b>	Jour
<b>J7 :</b>	Jour 7 du cycle oestral
<b>JEL :</b>	Jour en lactation
<b>JR :</b>	Jour de récolte (7 jours après insémination artificielle)
<b>K :</b>	Potassium
<b>LDH :</b>	Lactate deshydrogénase
<b>LH :</b>	Luteinizing hormone
<b>mmol/L :</b>	Millimole par litre
<b>Na :</b>	Sodium
<b>ng/mL :</b>	Nanogramme/millilitre
<b>P4 :</b>	Progestérone

<b>PGF 2<math>\alpha</math></b> :	Prostaglandine F 2 $\alpha$
<b>PGFM</b> :	13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin F2 $\alpha$ (métabolite du PGF 2 $\alpha$ )
<b>Pg/mL</b> :	Picogramme/millilitre
<b>PMN</b> :	Polymorphonucléaire neutrophile
<b>PT</b> :	Protéines totales
<b>RIA</b> :	Radioimmunoassay
<b>SOV</b> :	Surovulation, superovulation
<b>TE</b> :	Transferable embryos
<b>TP</b> :	Total proteins

## DÉDICACES

### **A Dieu tout puissant**

*D'avoir choisi d'œuvrer dans ma vie par amour et par générosité, d'avoir été toujours là pour moi, surtout dans les moments difficiles et de m'avoir donné la conviction que je peux arriver au terme de ce mémoire. Il a pourvu à mes besoins. Il a fait disparaître ma peur. Il m'a fait accomplir ce travail parce qu'Il peut le faire.*

### **A toute ma famille**

*Pour leur encouragement.*

### **A Rondro (Ikalapiso), Menja et Sata**

*Pour leur amitié, les moments passés ensemble, les parties de patin ainsi que leur soutien moral et leur encouragement.*

### **A « Dada sy Neny »**

*Qui m'ont donné et partagé le goût des études, pour leur soutien moral et encouragement.*

### **A mes frères**

*Pour leur encouragement.*

### **A Salohy**

*Pour m'avoir soutenue. Merci pour ce que tu es et pour ce que tu fais.*

### **A moi-même**

*Miorena tsara, aza miova! Pour mes efforts et contributions investi durant cette maîtrise.*

## REMERCIEMENTS

Au terme de cette maîtrise, j'aimerais adresser mes plus vifs remerciements :

- A Dr. Younès Chorfi pour avoir accepté d'être mon directeur de recherche, pour sa confiance, sa disponibilité, ses conseils ainsi que ses encouragements.
- A Dr. Réjean Lefebvre pour sa contribution, son professionnalisme, sa disponibilité, ses encouragements et ses précieux conseils.
- Aux Dr. Raynald Dupras et Dr. Louis Mills ainsi que leurs techniciennes respectives pour leur professionnalisme et leur disponibilité durant le temps qu'a nécessité la réalisation des prélèvements.
- Aux membres du jury d'évaluation de ce mémoire qui ont bien voulu consacrer une partie de leur temps pour juger ce travail, et cela malgré leurs maintes et innombrables occupations. Je leur suis entièrement reconnaissant de l'intérêt qu'ils ont porté à ce mémoire.
- A Guy Beauchamp pour l'aide dans les analyses statistiques.
- Au projet « La santé animale pour la santé populationnelle » initié par Dr. Normand Larivière pour le soutien financier et pour m'avoir permis de mener à terme cette maîtrise.
- À mes amis, pour leur amitié et les moments passés ensembles.
- A tous les personnes que j'ai côtoyées durant cette maîtrise.
- A tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

## INTRODUCTION

L'amélioration génétique des vaches a permis une augmentation importante de la production de lait et en même temps une réduction de la fertilité des vaches laitières (Wall *et al.*, 2003; Washburn *et al.*, 2002). La fertilité des vaches laitières se détériore de façon significative depuis les deux dernières décennies (Lucy, 2001; de Vries et Risco, 2005). L'application des biotechnologies de la reproduction dont le programme de synchronisation systématique des chaleurs et insémination à temps fixe n'a pas réussi à réduire la régression de la fertilité des vaches laitières.

Le traitement de suroovulation (SOV) des vaches consiste à obtenir le maximum d'ovocytes fécondables et d'embryons transférables (ET) capables de maintenir une gestation une fois transférés dans une vache receveuse (Armstrong, 1993). Malgré les avancées dans la compréhension de la folliculogénèse et son application dans la SOV, il est encore impossible de prédire le nombre d'embryons transférables et d'avoir des résultats constants (Thatcher *et al.*, 2001). Cette problématique constitue une source majeure de préoccupations des éleveurs.

La qualité et le nombre d'embryon récolté après une SOV varient chez une même vache et d'une vache à l'autre. Le taux d'ovulation et de fécondation des ovocytes conditionnent le nombre d'embryons pouvant être récoltés (Kafi et McGowan, 1997). Plusieurs facteurs, tels que le nombre de petits follicules présents au début d'une vague folliculaire au début de la SOV (Cushman *et al.*, 1999), l'âge, la race, l'anamnèse reproductive, la santé générale de l'animal, la qualité de la semence, l'habileté du médecin vétérinaire, le nombre de suroovulations consécutives (Lucy *et al.*, 1999), la méthode de SOV, la préparation des gonadotrophines (Lucy, 2000) ainsi que l'influence de la nutrition au moment de la conception (Santos *et al.*, 2008) ont été rapportés comme source de variation.

L'analyse des problèmes de fertilité et de fécondité s'avère complexe. Cependant l'étude des sécrétions du milieu utérin constitue un outil potentiel dans l'analyse des problèmes de fertilité des vaches laitières (Hugentobler *et al.*, 2008). Chez les vaches à une seule ovulation, le milieu utérin contribue à la survie de l'embryon durant ses premiers jours de séjour dans l'utérus (Albihn *et al.*, 1991). Les sécrétions utérines assurent le développement

du jeune embryon en apportant les nutriments essentiels à sa croissance et sa survie (Ellington, 1991).

Par ce que la contribution du milieu utérin durant les premiers jours de vie de l'embryon est une condition essentielle à sa survie et son développement chez les vaches à simple ovulation, cette condition devrait être aussi valable chez les vaches suroovulées pour que les embryons puissent se développer. Ainsi, l'hypothèse testée dans cette étude est que la SOV induirait des changements du milieu utérin qui entraîneraient une réduction ou augmentation du nombre d'ET récoltés. Les objectifs cette étude sont par conséquent de:

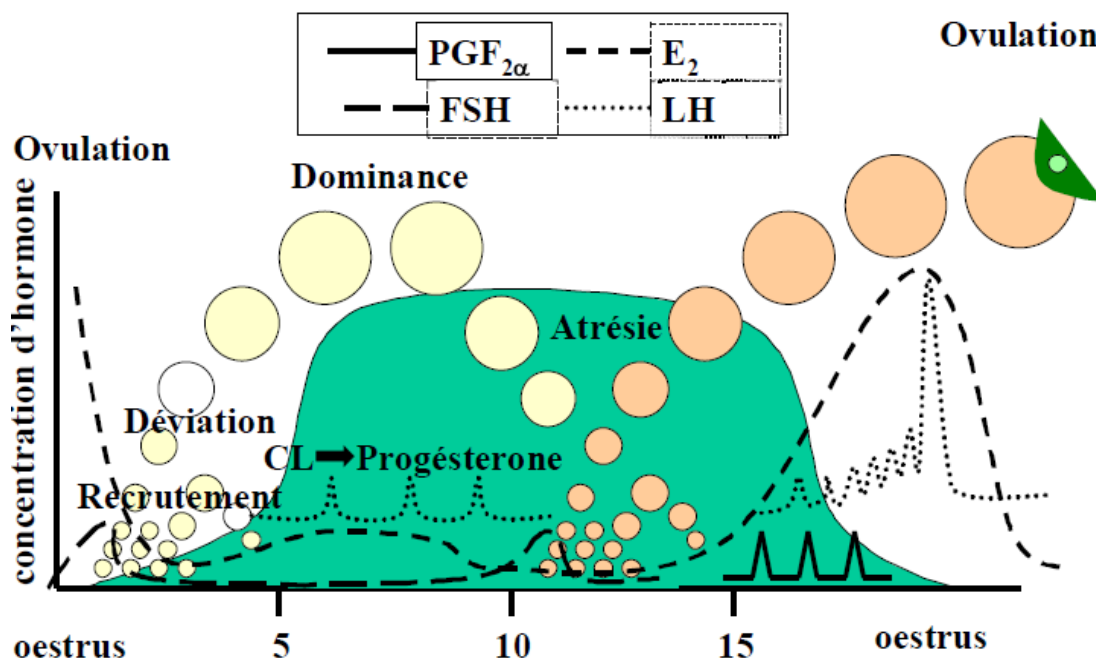
- (1) déterminer l'effet de la SOV sur la bactériologie et la cytologie utérine et leurs effets sur le nombre d'ET
- (2) déterminer l'effet de la SOV sur les paramètres biochimiques sérique et utérin, au jour 7 du cycle œstral (J7) et au jour de la récolte des embryons (JR) et leurs effets sur le nombre d'ET.



## RECENSION DES ÉCRITS

### I. Physiologie du cycle œstral de la vache

Le cycle œstral de la vache (figure 1) est le résultat des interactions de plusieurs hormones sécrétées par l'hypothalamus, l'hypophyse antérieure, les ovaires et l'utérus (Mapletoft, 2006). Parmi ces hormones figure l'hormone hypothalamique GnRH (Gonadotropin-Releasing hormone), les hormones hypophysaires FSH (Follicle Stimulating Hormone), LH (Luteinizing Hormone) et ocytocine, les hormones ovariennes l'androstènedione, l'estradiol  $17\beta$  ( $E_2$ ) et la progestérone ( $P_4$ ), et la prostaglandine  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) produite par les cellules endométriales



**Figure 1 :** Évènements hormonaux et ovariens du cycle œstral de la vache à 2 vagues folliculaires (adapté de Adams et *al.* (2008)).

#### A. Phases du cycle œstral

Le cycle œstral de la vache dure en moyenne 18 à 24 jours. La phase folliculaire du cycle œstral de la vache est assimilée à une série de vagues folliculaires (Rajakoski, 1960). En

fonction des vaches, un cycle peut renfermer 2, 3 voire même 4 vagues folliculaires (Zeitoun et *al.*, 1999) et comporte 4 phases :

### **1. Jour 0 (J 0) : Œstrus ou chaleur**

C'est la période durant laquelle la vache ou la génisse extériorise son comportement sexuel. La vache se laisse monter par les autres femelles ou le taureau. L'apparition de l'œstrus est précédée par une augmentation graduelle de la concentration de la FSH associé à une concentration maximale de la LH (Bernard et *al.*, 1984). Vingt quatre heures avant le début de l'œstrus, la concentration de l'E2 est à son maximale (Glencross et Pope, 1981). L'œstrus dure de quelques heures à 24 heures (10 à 12 heures en moyenne chez la vache contemporaine) pendant laquelle un mugissement, une hyperactivité et une décharge de glaire cervicale peuvent être observés (Roelofs et *al.*, 2005).

### **2. J 1 à J 3 : Metœstrus**

C'est la période d'ovulation qui est un processus inflammatoire (Richards et *al.*, 2002), car elle peut être bloquée par injection intra folliculaire d'inhibiteur de prostaglandines (Hansel et Convey, 1983). L'ovulation est accompagnée de la relâche post ovulatoire de la FSH qui permet le recrutement et l'émergence d'une nouvelle vague folliculaire. À J 1, la première vague folliculaire débute et les follicules émergents possèdent un diamètre de 3 à 4 mm (Lussier et *al.*, 1994). La période est suivie par le début de la phase lutéale durant laquelle, une faible concentration de P4, d'E2 ainsi que de LH est observée (Niswender et *al.*, 2000). La croissance des follicules de la nouvelle vague émergente se poursuit et les cellules de la granulosa du follicule ovulé commencent déjà à sécréter une petite quantité de P4 et à former le nouveau corps jaune (CJ) (Roelofs et *al.*, 2005).

### **3. J 4 à J 16 : Diœstrus**

C'est la phase la plus longue du cycle, car elle dure environ 12 jours et se divise en trois périodes distincts :

- **Début du diœstrus (J 4 à J 5)** : caractérisé par la sélection du follicule dominant qui est dans 80% des cas, le follicule possédant un diamètre de 9 mm (Kulick et *al.*, 2001). Dix à vingt quatre heures suivant la sélection du follicule dominant, la FSH est à sa concentration basale. La diminution de la FSH est temporellement associée à l'augmentation de la concentration d'E2 et d'inhibine dans le follicule dominant. Cette augmentation de l'E2 est favorisée par la fixation de la LH sur les récepteurs de la granulosa du follicule dominant en stimulant la production d'androstènedione. L'androstènedione à l'aide de l'enzyme aromatase se transforme en E2 (Kaneko et *al.*, 1995). À côté, la sécrétion de P4 par le CJ augmente progressivement jusqu'à atteindre 2 ng / ml dans le sang (Ginther et *al.*, 1996).

- **Milieu du diœstrus (J 5 à J 10)** : le follicule dominant poursuit sa croissance, passant de 9 à 13 mm de diamètre (Lussier et *al.*, 1994), en sécrétant en même temps de E2 et d'inhibine (Kaneko et *al.*, 1995). À côté, les follicules subalternes ne dégèrent pas immédiatement et gardent leur capacité de devenir dominant et éventuellement à remplacer le premier follicule dominant pour une période de 24 h, s'il venait à disparaître (Gibbons et *al.*, 1997). Vers J 9, le follicule dominant de la première vague dégère par atresie et entraîne la diminution de l'E2 et d'inhibine. L'absence de ces inhibiteurs de croissance des follicules subalternes permettent à l'hypophyse d'induire la relâche de la FSH qui permet le recrutement d'une nouvelle vague folliculaire (Gibbons et *al.*, 1997). Entre J 8 et J 10, le CJ est à son développement maximal et sécrète une concentration maximale de P4. Sous l'action de cette dernière, les cellules endométriales restent dans un état quiescentes. Cependant elles continuent à répondre à divers facteurs stimulants tels que l'ocytocine (Okuda et *al.*, 2002). En même temps, la P4 inhibe la relâche de la PGF 2 $\alpha$  et la régression du CJ (Lamming et Mann, 1999).

- **Fin du diœstrus (J 10 à J 16)** : caractérisé par le recrutement de la deuxième vague folliculaire et la sélection du follicule dominant de la deuxième vague. La présence de la concentration élevée de P4 fait qu'il y a une augmentation moins marquée de LH durant la deuxième vague (Kulicke et *al.*, 2001). Sous l'action de la P4, les récepteurs de P4 des cellules endométriales se désensibilisent et favorisent la synthèse des récepteurs de E2. La fixation de E2 à son récepteur stimule à son tour la synthèse des récepteurs de l'ocytocine et par conséquent la synthèse et la sécrétion de PGF 2 $\alpha$  (Okuda et *al.*, 2002).

#### **4. J 16 à J 21 : Prœstrus**

Vers la fin du diœstrus, les neurones hypophysaires sécrètent l'ocytocine qui induit au niveau des cellules de l'endomètre la sécrétion de PGF 2 $\alpha$ . Cette hormone stimule la production d'ocytocine par le CJ qui à son tour augmente la production de PGF 2 $\alpha$ . Cette dernière induit la lyse du CJ et entraîne une diminution de P4 à sa concentration basale (Poyser, 1995). Le prœstrus correspond au début de la phase folliculaire. La croissance folliculaire se poursuit jusqu'à la sélection du follicule dominant (Lussier et *al.*, 1994). De J 16 à J 19, la fréquence de relâche de LH augmente et la production d'E2 par le follicule dominant atteint son seuil critique provoquant la relâche préovulatoire de LH et par conséquent l'apparition de l'œstrus (Hansel et Convey, 1983).

### **B. Folliculogenèse chez la vache laitière**

À la naissance, les deux ovaires de la génisse disposent d'une réserve de follicules primordiaux (en majorité au stade quiescent) estimés aux environs de 133 000. Cette réserve reste relativement stable jusqu'à l'âge de 4 ans et tend à diminuer progressivement par la suite pour disparaître vers l'âge de 20 ans (Erickson, 1966). La croissance de ces follicules primordiaux sera initiée à divers temps de la vie de l'animal. Une très faible proportion des follicules seulement poursuivra leur croissance (99% de la réserve vont dégénérer) (Erickson, 1966).

#### **1. Potentiel clinique de la folliculogenèse**

Lefebvre et *al.* (2007) proposait une estimation du nombre de follicules utilisé par une vache durant sa vie reproductive sur la base d'un modèle d'une vache à 2 vagues folliculaires qui cycle régulièrement tous les 21 jours avec une moyenne de 18 follicules recrutés par cycle (9 follicules par vague). Sur la base d'une moyenne de 17 cycles par an et pour 5 ans de vie reproductive, les résultats montrent qu'il y a une faible exploitation clinique de la capacité reproductive de la vache, car elle n'utilise que 1 530 follicules, soit 0.06% de sa réserve folliculaire.

## 2. Concept de la folliculogénèse

La folliculogénèse est un processus incluant la formation des follicules primordiaux suivi de leur développement jusqu'à leur ovulation (McGee et Hsueh, 2000). En général, la folliculogénèse comporte deux phases, préantral (follicules primordiaux, primaires et secondaires) et antral (follicule tertiaire). Le stade antral dure en moyenne 39 à 41 jours (Lussier et *al.*, 1987) durant le quel, il y a une phase de croissance lente (de 0.2 à 3 ou 4 mm de diamètre) et une phase de croissance rapide qui est gonadotrophine dépendante (depuis le recrutement jusqu'à l'atrésie ou l'ovulation du follicule dominant).

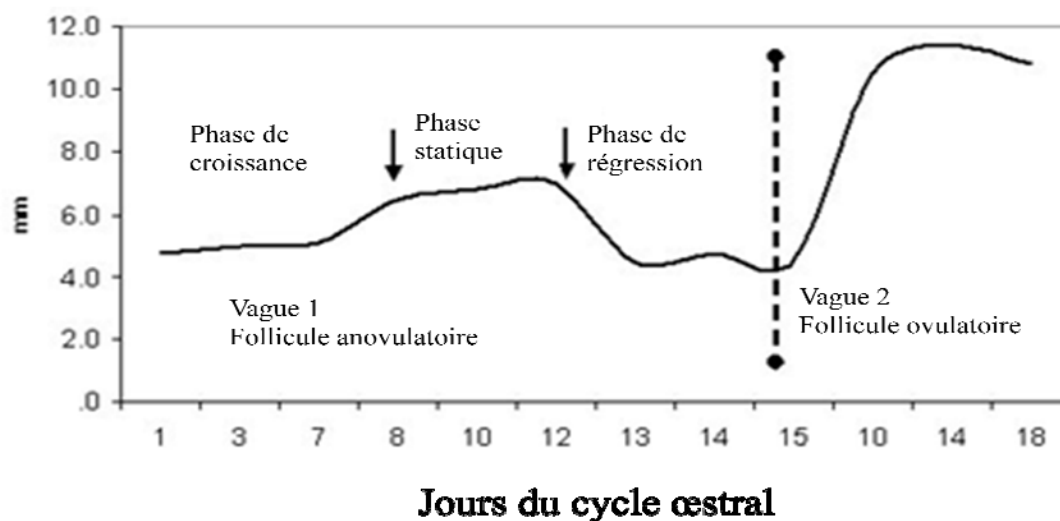
Chez la vache, la phase macroscopique de la folliculogénèse est assimilée à une série de vague folliculaire, un mode de croissance cyclique des follicules antraux (Rajakoski, 1960) qui correspond à des processus de croissance et de régression des follicules antraux aboutissant à la formation du follicule pré-ovulatoire (Taylor et Rajamahendran, 1991).

Une augmentation significative de FSH précède toujours l'émergence des vagues folliculaires (Lussier et *al.*, 1994). En fonction des vaches, le cycle œstral peut comporter 2 à 4 vagues folliculaires. Cependant les cycles à 2 et 3 vagues sont les plus fréquents et représentent 95% des cycles œstraux (Fortune, 1994). Dans la majorité des cas, le premier follicule dominant régresse et entraîne l'émergence de la nouvelle vague (Ginther et *al.*, 1996). Chez les vaches à 2 vagues, la première vague survienne au jour 1 tandis que la deuxième aux environs du jour 9 ou 10 du cycle œstral. Chez les vaches à 3 vagues, la première vague survient au jour 1, la deuxième au jour 8 ou 9 et la dernière aux environs du jour 15 ou 16 du cycle œstral (figure 2; Ginther et *al.*, 1996). L'ovulation se produit en général à partir du follicule dominant de la dernière vague du cycle œstral (Savio et *al.*, 1990). Ainsi pour une vache à 2 vagues, la maturation du follicule dominant coïncide avec la régression spontanée du CJ ou lutéolyse durant la 2<sup>ème</sup> vague suivi de la libération de l'ovule (Taylor et Rajamahendran, 1991).

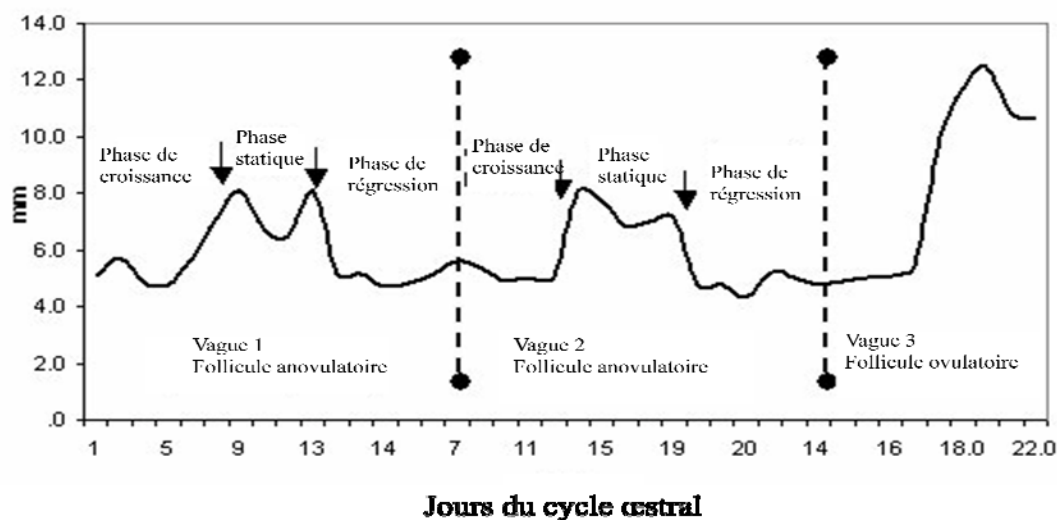
**Figure 2** : Schéma général des moments de l'émergence des vagues folliculaires durant le cycle œstral (adapté de Savio et *al.*, 1990)

Chaque vague folliculaire comporte 3 phases :

- **Recrutement** : à chaque début de vague folliculaire, une cohorte moyenne de 9 petits follicules antraux de 3 à 4 mm de diamètre sont recrutés. Dans de rares occasions, la cohorte peut avoir jusqu'à 40 petits follicules (Ginther et *al.*, 2001). Deux à quatre jours après le recrutement, les follicules ont un diamètre moyen de 6 à 9 mm et deviennent visible à l'échographie (Lussier et *al.*, 1994). Sous l'action de la FSH, les follicules de la cohorte continuent leur croissance et leur différenciation. Le follicule le plus gros a un taux de croissance de 1,5 à 2 mm par jour. (Noseir, 2003).
- **Sélection** : un seul des petits follicules de la cohorte sera sélectionné. Ce follicule correspond au premier follicule qui acquière les récepteurs de LH (Adams et *al.*, 1993). Le follicule sélectionné poursuit sa croissance et devient le follicule dominant (Hodgen, 1982). La dimension et le moment de sélection du follicule dominant (figures 3 et 4) ainsi que le temps de recrutement d'une nouvelle cohorte varient en fonction des nombres de vagues du cycle œstral (Noseir, 2003).



**Figure 3 :** Profil de la sélection du follicule dominant d'une vache laitière à 2 vagues folliculaires (adapté de Noseir, 2003)



**Figure 4 :** Profil de la sélection du follicule dominant d'une vache laitière à 3 vagues folliculaires (adapté de Noseir, 2003)

- **Dominance** : le follicule dominant possède un diamètre d'au moins de 10 mm et il a la capacité, à cause de son effet inhibiteur, de prévenir la croissance des follicules subordonnés et le recrutement de nouveaux petits follicule (Hodgen, 1982). Il semble que l'effet de dominance serait à l'origine de l'action des protéines présentes dans le liquide folliculaire qui semblent avoir un effet inhibiteur sur la croissance des follicules subordonnés (Kastelic et *al.*, 1990 b; Adams et *al.*, 2008).

### 3. Manipulation et application de la folliculogénèse

La précision de l'ovulation résulte du contrôle des vagues folliculaires durant le cycle œstral. La manipulation des vagues folliculaires est l'une des clés principales des protocoles de reproduction synchronisée (Bergfelt et *al.*, 1994) ainsi que le programme de SOV et de transfert embryonnaire chez la vache laitière (Mapletoft, 2002). L'émergence de la vague folliculaire peut être contrôlée mécaniquement par aspiration du follicule dominant à l'aide d'une sonde à travers le vagin ou par des traitements hormonaux à l'aide de GnRH et de la combinaison de P4 et d'E2 (Bo et *al.*, 1995). Par exemple : le contrôle de la dynamique des vagues folliculaires à l'aide du protocole Ovsynch a permis d'éliminer le besoin de détecter la chaleur des vaches et de faire une insémination artificielle (IA) à temps fixe (Pursley et *al.*, 1995). Le contrôle de l'émergence de la vague folliculaire à l'aide des traitements hormonaux offre l'avantage d'initier le traitement de SOV sans tenir compte du jour du cycle œstral (Bo et *al.*, 1995). En effet, le contrôle de l'émergence d'une vague folliculaire à l'aide de la combinaison de P4 et d'E2 a permis d'obtenir de meilleurs résultats ( 4 à 6 ET) de la SOV chez la vache laitière (Mapletoft et *al.*, 2002).

## II. Surovulation chez la vache laitière

La SOV est la première étape du programme de transfert embryonnaire qui consiste à produire le maximum d'ovocytes fécondables et d'ET capables de produire une gestation (Armstrong, 1993). La SOV, c'est un traitement de stimulation de la croissance folliculaire des ovaires d'une vache donneuse à l'aide des gonadotrophines (mélange de FSH et de LH) qui vise à amener un nombre maximal de follicules à ovuler de manière synchrone.



### A. Sélection de la vache donneuse

La donneuse doit avoir un minimum de 8 mois d'âge. Dans la plupart des cas, les donneuses choisies sont en majorité des vaches du fait de la connaissance de leurs performances productives et reproductrice (Keller et Teeper, 1990). Le plus souvent, la sélection de la donneuse s'opère en fonction de son mérite génétique. La donneuse doit être de la classe très bonne ou excellente en termes de conformité (Mapletoft, 1985). Le choix peut être aussi fait en fonction des caractères bien fixés et transmis dans la lignée (le nombre de filles dans l'étable par exemple).

L'anamnèse reproductrice de la donneuse est très importante. Un examen général et génital de la donneuse peut être fait pour sélectionner la donneuse potentielle et pour avoir une bonne réponse (Mapletoft, 1985). Les vaches possédant des chaleurs irrégulières, des kystes ovariens et des infections utérines sont à éliminer. Les donneuses à sélectionner sont, par exemple, celles qui sont normales aux examens général et génital (sécrétions génitales normales) et celles qui ont des chaleurs régulières et des mises bas normales. Le rétablissement des fonctions reproductrices, incluant l'involution utérine complète, la reprise du cycle œstral et l'élimination des infections utérines, est indispensable avant la SOV. De plus, la donneuse sélectionnée devrait avoir terminé sa période d'annovulation post partum. Aussi, une période d'au moins 70 jours après mise bas est nécessaire avant la SOV (Mapletoft, 2006). À 70 jours en lait (JEL), le pic de lactation est atteint, la balance énergétique négative diminue progressivement et permet une fonction reproductrice efficiente (Santos et *al.*, 2008).

La donneuse peut être aussi choisie en fonction de son profil de P4. Une mesure de la concentration de P4 dans le sang (Callesen et *al.*, 1988) et dans le lait (Herrler et *al.*, 1990) durant la période pré-ovulatoire permet d'exclure les donneuses non potentielles. Le nombre d'ET varie significativement en fonction de la concentration dans le lait et du profil plasmatique de P4 (Callesen et *al.*, 1988). Selon Herrler et *al.* (1990), les donneuses ayant une concentration de  $P4 < 10.7 \pm 1.3$  ng/mL produisent moins de CJ, d'ovocytes et/ou embryons et d'ET comparativement aux donneuses ayant une concentration de  $P4 \geq 10.7 \pm 1.3$  ng/mL ( $3.4 \pm 1.0$  vs  $10.8 \pm 0.7$  CL;  $1.7 \pm 0.8$  vs  $6.2 \pm 0.9$  ovocytes et/ou embryons;  $1.2 \pm 0.7$  vs  $2.8 \pm 0.4$  ET).

## B. Procédure de la SOV

L'initiation de la SOV consiste à supprimer les effets du follicule dominant et à initier une nouvelle vague folliculaire pour avoir une ovulation simultanée de plusieurs follicules à l'aide de gonadotrophines, préparées à partir des extraits pituitaires de porc et de eCG (equine chorionic gonadotrophin) (Murphy et *al.*, 1984). Les gonadotrophines diffèrent l'une de l'autre par leurs compositions en FSH et LH (Murphy et *al.*, 1984). Plusieurs produits ont été disponibles sur le marché : FSH-P (100% FSH); NIH-FSH-P1 (68% FSH et 32% LH); Folltropin V<sup>®</sup> (84% FSH et 16% LH, Mapletoft et *al.*, 2002). Actuellement, au Canada, l'hormone la plus utilisée dans le traitement de SOV est la Folltropin V<sup>®</sup>. C'est un extrait pituitaire porcin constitué de 84% de FSH et 16 % de LH (Mapletoft, 2002).

### 1. Synchronisation de la vague folliculaire en vue d'une SOV

En se référant au protocole conventionnel, dont l'initiation de la SOV se fait entre le 8<sup>ème</sup> et le 12<sup>ème</sup> jour du cycle, la probabilité que le follicule dominant ne soit pas fonctionnel durant cette période du cycle est approximativement de 30% pour les cycles à 2 vagues et de 35% pour les cycles à 3 vagues. De plus, seulement 20% (4 à 5 jours) du cycle est disponible pour l'initiation de la SOV au moment de l'émergence de la vague folliculaire. Autrement dit, 80% de la durée du cycle n'est pas optimal pour l'initiation du traitement de SOV (Bo et *al.*, 2002). Ainsi, l'initiation du traitement entre le 8<sup>ème</sup> et le 12<sup>ème</sup> jour du cycle nécessite une attente et une détection de la chaleur de la donneuse.

Afin d'éliminer l'attente et le besoin de détecter la chaleur, une approche alternative qui consiste à synchroniser l'émergence de la vague folliculaire a été développée. Plusieurs approches peuvent être réalisées comme l'ablation mécanique du follicule dominant (Adams et *al.*, 1993; Bergfelt et *al.*, 1994), l'usage de P4 (Savio et *al.*, 1993; Stock et Fortune, 1993), de E2 (Adams et *al.*, 1994; Bo et *al.*, 1994), de GnRH (Savio et *al.*, 1991) et de hCG (Calder et Rajamahendran, 1992; Rajamahendran et Sianangama, 1992). Selon les études, la synchronisation de la vague folliculaire peut se faire de trois façons :

- **Aspiration folliculaire** : l'aspiration peut être faite sans considérer le jour du cycle. La méthode consiste à aspirer tous les follicules de plus de 5 mm de diamètre à l'aide

d'échographie téléguidé (Bergfelt et *al.*, 1994; Garcia et *al.*, 1998). L'aspiration de ces follicules supprime leur effet (E2 et inhibine) sur la relâche de la FSH et permet l'augmentation de la sécrétion de la FSH ainsi que l'émergence d'une nouvelle vague folliculaire, 1 jour après le traitement.

- **Injection de GnRH ou de LH porcine** : le GnRH ou la LH porcine induit l'ovulation et entraîne l'émergence d'une nouvelle vague (Macmillan et Thatcher, 1991; Martinez et *al.*, 1999). Cependant, la GnRH n'induit toujours pas l'ovulation compromettant ainsi l'émergence et la synchronisation de la nouvelle vague folliculaire. Les résultats du traitement donnent lieu à une asynchronie de la vague folliculaire (Martinez et *al.*, 1999).

- **Combinaison de P4 et E2** : D'après les études menées par Bo et *al.* (1996), le traitement de SOV peut être fait sans tenir compte du jour du cycle. Les séries d'expériences réalisées montrent que l'injection intramusculaire (im) d'E2 supprime la croissance des follicules antraux, mais cet effet supprimeur semble plus efficace si l'injection d'E2 est associée à une administration de P4. L'action combinée de P4 et de E2 supprime l'effet de la FSH et possiblement de la LH (Bo et *al.*, 1996). Le début de la régression des follicules et le métabolisme de l'E2 exogène entraînent la relâche de la FSH et l'émergence d'une nouvelle vague 1 jour plus tard. En outre, la combinaison de E2 et de P4 rend possible la SOV des vaches non cyclées. L'efficacité de la combinaison réside dans le fait que la P4 prévient, tandis que l'E2 induit la relâche pré-ovulatoire de la LH chez les animaux qui n'ont pas de CJ fonctionnel. De plus, l'E2 entraîne la régression des follicules LH dépendant et permet l'émergence d'une nouvelle vague (Bo et *al.*, 1996). Dans la pratique, 5 mg d'E2 et 50 à 100 mg de P4 sont injectés au moment de l'insertion de l'implant (CIDR) de P4 (Bo et *al.*, 1995; Bo et *al.*, 1996).

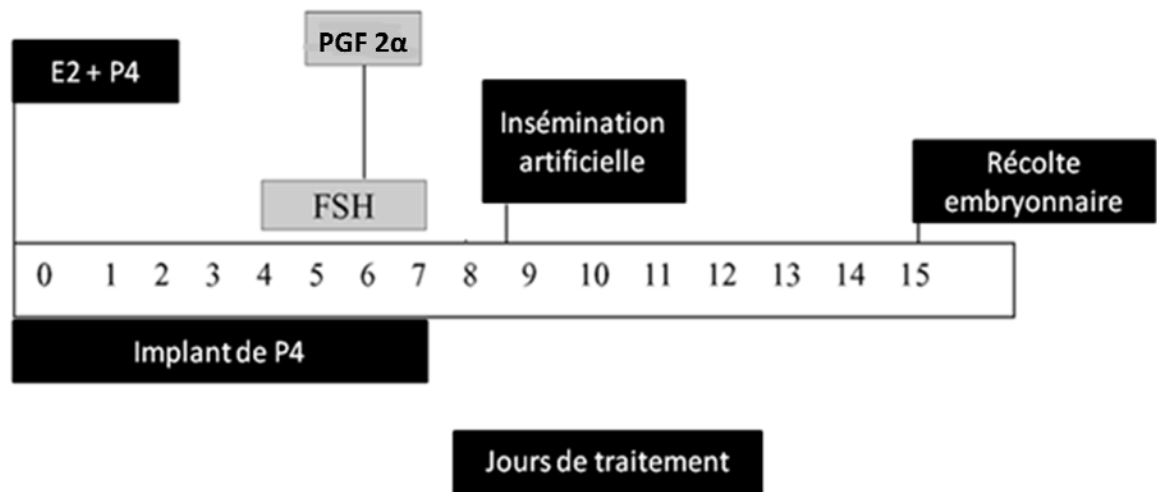
L'indisponibilité de l'E2 sur le marché a incité les chercheurs à l'utilisation des esters d'œstrogène (œstradiol benzoate et valerate). D'après les résultats des expériences menées par Bo et *al.* (2002), l'œstradiol benzoate et valerate montrent des réponses similaires à l'E2 et donnent lieu à l'émergence d'une nouvelle vague de follicule 3 à 4 jours plus tard.

## 2. Protocole conventionnel de SOV

L'initiation du traitement de SOV entre le 8<sup>ème</sup> et le 12<sup>ème</sup> jour du cycle œstral a permis d'avoir une meilleure réponse (Bo et *al.*, 1995). Il semble que la période entre le 8<sup>ème</sup> et le 12<sup>ème</sup> jour du cycle coïncide avec le moment de l'émergence de la deuxième vague (chez les vaches à 2 et 3 vagues folliculaires) durant la quelle il y a croissance d'une cohorte de follicules (Ginther et *al.*, 1989). Il est à noter que le protocole conventionnel n'a pas pris en compte le statut folliculaire au moment du traitement de SOV. De plus, il possède un inconvénient qui est la nécessité de détecter les chaleurs. Malgré la variation dans l'émergence de la deuxième vague durant le cycle œstral, la performance du protocole conventionnel a été améliorée par l'utilisation de la combinaison de P4 et d'E2 (Mapletoft et *al.*, 2009). Cette combinaison permet d'initier le protocole sans tenir compte du jour du cycle et de la détection des chaleurs.

Le protocole amélioré consiste à introduire l'implant de P4 dans le vagin de la vache avec une injection simultanée d'E2 et de P4. Quatre jours après l'introduction de l'implant de P4, le traitement à l'aide de Folltropin V<sup>®</sup> est initié et dure pendant 3 à 5 jours. L'implant de P4 est retiré au moment de l'injection de PGF 2 $\alpha$  qui se fait aux J 6 ou 7. Les chaleurs apparaissent 36 à 48 heures après cette injection. Généralement, deux IA sont faites 12 et 24 heures après le début des chaleurs.

La nécessité de la répétition de l'injection de Folltropin V<sup>®</sup> (constitué de FSH et 16% de LH) résulte du faible temps de demi-vie de la FSH (5 heures en moyenne) (Mapletoft et *al.*, 2002). Ainsi l'injection du produit doit être répétée pour induire la SOV. La PGF 2 $\alpha$  est utilisée pour induire la lutéolyse et avoir une précision sur le début des chaleurs ainsi que le moment des ovulations (figure 5).



**Figure 5 :** Protocole de SOV utilisant la P4, E2, FSH et PGF 2α (Baruselli et *al.*, 2006, reproduit et traduit)

Voici un exemple de doses et de la cédule des injections proposé par Bo et *al.* (2005) avec lequel, il est possible de répéter le traitement tous les 30 jours sans recours à la détection des chaleurs.

Le protocole standard de la SOV peut être résumé comme suit :

- Jour 0 : insertion de l'implant vaginal de P4, injection de 5 mg d'E2 et 100 mg de P4
- Jour 4 : injection de 80 mg de Folltropin V® im
- Jour 5 : injection de 60 mg de Folltropin V® im
- Jour 6 avant midi : injection de 40 mg de Folltropin V® im, injection de PGF 2α im
- Jour 6 après midi : injection de 40 mg de Folltropin V® im, retrait de l'implant de P4
- Jour 7 : injection de 20 mg de Folltropin V® im
- Jour 8 après midi : IA
- Jour 9 avant midi : IA
- Jour 15 : Récolte embryonnaire et injection de PGF 2α im
- Jour 30 : Ré-insertion d'implant de P4, injection de 5 mg d'E2 et 100 mg de P4 im

### **C. Déterminants de la réponse de SOV**

L'un des facteurs limitant de la réussite du programme de transfert embryonnaire chez la vache est la variation importante du nombre d'embryons obtenus après SOV (Hasler et *al.*, 1983). La faible réponse de la SOV peut être due à la perturbation des fonctions physiologiques de l'axe hypothalamus-hypophyse et ovaire-utérus durant le traitement (Kafi et McGowan, 1997). Il semble même que le faible nombre d'ET récolté résulte de la perturbation du transport des spermatozoïdes dans l'oviducte (Kafi et McGowan, 1997).

Une étude réalisée par Looney (1986) sur 2048 vaches suroovulées montre que 24% des récoltes embryonnaires ne donnent pas d'ET, 64% produisent moins de 5 ET. Au final, 70% d'ET sont produits seulement par 30% des donneuses. En moyenne, chaque donneuse donne 11,5 ovules et embryons dont 5 ET. Les résultats de la SOV varient selon les études rapportées par plusieurs auteurs dont Hasler et *al.* (1983), Betteridge et Smith (1988), Armstrong (1993). Plusieurs facteurs sont à l'origine de cette variation (Kafi et McGowan, 1997; Mapletoft et *al.*, 2002) :

#### **1. Facteurs intrinsèques à la donneuse**

##### **a. Âge**

Lerner (1986) rapporte que l'augmentation de l'âge de la donneuse a une influence négative sur la réussite de la SOV et sur la production d'ET. Cette influence négative résulte de la variation de la réponse à la FSH. Il semble qu'à partir de 6 à 9 ans, les vaches tendent à donner un grand nombre d'ovocytes non fécondés et un faible nombre d'ET. Cette diminution est due à la réduction du nombre des follicules capables de répondre au traitement de gonadotrophines (Lerner et *al.*, 1986) ou de la compétence des ovocytes (Pritpal et *al.*, 2007). Cependant l'âge n'est pas le facteur déterminant de la variation de la réponse de la SOV (Hasler, 1992). Le faible taux de récolte chez les donneuses âgées serait due à la réduction de la compétence des ovocytes à ovuler (Pritpal et *al.*, 2007).

## b. Santé

- En cas de présence de mammites, il y a une augmentation de sécrétion de cortisol qui inhibe la sécrétion des gonadotrophines (Barros et *al.*, 1992), affectant, par conséquent la réussite de la SOV. En outre, les mammites entraînent une augmentation de la température corporelle de la vache qui affecte négativement le développement des embryons (Kafi et McGowan, 1997).
- La présence d'infections virales : d'après Liess (1990), 90% des infections à pestivirus sont inapparentes. La réduction significative de la performance reproductrice des troupeaux résulte de l'IA des vaches infectées par les pestivirus (BVD et IBR; Kirkland et *al.*, 1990; McGowan et Kirkland, 1995). L'impact de ces infections à pestivirus sur la réponse de la SOV a été évalué par Kafi et *al.* (1997) à l'aide de séries d'expériences. Les résultats montrent que les vaches infectées donnent peu de CJ palpable et un faible nombre d'ET par rapport aux vaches non infectées de BVD et IBR. Il semble qu'un faible taux d'ovulation est la cause de la faible réponse des vaches infectées (Kafi et *al.*, 1997).
- La présence d'infections utérines : plusieurs facteurs comme la rétention placentaire, la dystocie et délai d'expulsion des lochies prédisposent la vache aux infections bactériennes utérines. Suite au vêlage, la majorité des vaches se retrouve avec une contamination bactérienne de l'utérus. Les bactéries les plus impliquées sont *Escherichia coli*, *Arcanobactérium pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphilococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Pasteurella multocida*, *Clostridium spp*, *Bacterioides spp* et *Fusobacterium spp* (Bondurant, 1999; Sheldon, 2004). La présence de ces bactéries dans l'utérus génère une inflammation utérine (métrite, endométrite) agissant au niveau des ovaires, de l'hypothalamus et de l'hypophyse (Sheldon, 2004) qui, par conséquent, pourrait modifier la réponse de la SOV. L'impact des infections utérines postpartum sur l'altération des fonctions ovariennes pourrait résulter de l'action des pathogènes en cause. Peter et *al.* (1989) a démontré que l'infusion intra utérine de l'endotoxine d'*Escherichia coli* durant la période préovulatoire entraîne l'augmentation de la sécrétion du cortisol, la suppression de sécrétion de LH ainsi que l'absence d'ovulation. La plupart des infections utérines ont été associées aux modifications de profils hormonaux des vaches qui peuvent être à l'origine de la variation des réponses de la SOV. Par exemple, une endométrite clinique ou

subclinique peut être associée à un profil anormal de la P4 entraînant une anovulation, des kystes ovariennes et une longue phase lutéale (Opsomer et *al.*, 2000; Royal et *al.*, 2000). Ces anomalies résultent de la perturbation des sécrétions de GnRH par les produits libérés par les bactéries (Karsch et *al.*, 2002). L'évaluation de l'état de l'utérus et le diagnostic de ces infections peuvent être faits à l'aide de la cytologie et bactériologie endométriale qui permet de caractériser et de quantifier la réaction inflammatoire de l'utérus.

### **c. Stade du cycle œstral au moment de la SOV**

Le statut ovarien ainsi que la qualité de l'ovocyte au moment de la SOV a toujours été considéré comme le facteur déterminant de la réponse à la SOV chez la vache (Monniaux et *al.*, 1983; Bo et *al.*, 2002). Il semble que la réponse à la SOV peut être prédite en fonction du nombre de follicules supérieure ou égale à 2 mm de diamètre au moment de l'émergence de la vague folliculaire (Singh et *al.*, 2004).

La présence du follicule dominant est un facteur limitant de la réussite de la SOV (Guilbault et *al.*, 1991; Huntinen et *al.*, 1992; Lussier et *al.*, 1995). Une diminution de la réponse à la SOV et un faible nombre d'embryons récoltés ont été attribués à la présence de larges follicules, de plus de 10 mm de diamètre, au moment de la SOV (Grasso, 1989). Ces résultats ont été confirmés par Bungartz et Niemann (1994) sur la base de SOV faite en présence de follicule dominant. L'initiation de la SOV en présence ou après la sélection du follicule dominant résulte en un faible taux d'ovulation à cause de son effet inhibiteur sur la croissance des petits follicules recrutés durant la SOV (Adams et *al.*, 1993). Par contre, la suppression du follicule dominant 48 heures avant la SOV a un effet promoteur de la croissance folliculaire et donne lieu à un taux d'ovulation élevée avec moins de variations du nombre d'ET (Guilbault et *al.*, 1991; Kim et *al.*, 2001). L'initiation de la SOV en présence de 9 à 10 follicules de 3 à 8 mm de diamètre donne lieu à une augmentation significative du taux d'ovulation et de nombre d'ET (Bergfelt et *al.*, 1994; Garcia et *al.*, 1998).

Les résultats de SOV sont les mêmes si les traitements ont été initiés au moment de l'émergence de la première ou de la deuxième vague du fait qu'il n'y a pas de différence du nombre de follicules recrutés, du nombre d'ovulations induites et du nombre d'embryons et



d'ovocytes récoltés entre l'initiation de la SOV durant la première ou la deuxième vague folliculaire (Adams, 1994). Par contre, l'initiation de la SOV 1 jour après l'émergence des vagues semble réduire la réponse du traitement car peu de follicules sont recrutés résultant en un faible taux d'ovulation (Nasser et *al.*, 1993).

#### **d. Variation du temps de maturation des follicules et moment de l'IA**

Il semble que la différence en termes de stade de développement des embryons récoltés après la SOV résulte de la variation du temps de maturation des follicules et du moment de l'IA (Dominko et Firsti, 1997). En effet, 35 heures après IA, la plupart des embryons sont au stade de 2 cellules. L'IA juste après la formation des corps polaire de l'ovocyte donne lieu à une diminution du taux de clivage de l'embryon au stade de 8 cellules. Par contre, la retardation de l'IA améliore significativement le développement des embryons au stade de 8 cellules, car ce délai permet un bon développement et une bonne maturation de l'ovocyte et éventuellement la réussite de la fécondation (Dominko et Firsti, 1997).

Durant la SOV, des follicules ovulent alors que d'autres n'ont pas encore achevés leur croissance. La maturation des follicules des vaches surovulées ne se fait pas en même temps. La SOV induit une relâche précoce de la LH qui ne permet pas aux follicules d'acquérir une maturation adéquate. Ce phénomène résulte de la perte des activités mitotiques et de l'expansion de la membrane de la granulosa des follicules 24 à 26 heures après le pic de LH (De Loos et *al.*, 1991b). Ces anomalies ont été rapportés, surtout lorsque la SOV a été faite à l'aide de l'eCG (Murphy et Martinuk, 1991; Laurincik et *al.*, 1993a).

L'asynchronie de l'ovulation des follicules résulte de l'action de la LH contenu dans les gonadotrophines utilisées et la production de P4 vers la fin de la SOV (Callesen et *al.*, 1988). La LH des gonadotrophines induit l'ovulation des follicules larges au début de la SOV tandis que la présence de P4 élevé (due à la supplémentation de P4, CIDR) durant la période préovulatoire entraîne la défaillance de l'expression de la chaleur ainsi que la relâche de la LH. La défaillance de la relâche de la LH perturbe l'activité mitotique des follicules qui retarde l'ovulation (Foote et Ellington, 1988).

## **2. Facteurs extrinsèques à la donneuse**

### **a. Température, saison et environnement**

- Les génisses suroovulées sous l'influence du stress thermique produisent plus d'embryons anormaux (Putney et *al.*, 1988). Les températures et humidité élevée altèrent la croissance des follicules (Wolfenson et *al.*, 1995) en affectant négativement les cascades enzymatiques de la stéroïdogenèse des cellules de la thèque des follicules (Misra et *al.*, 1993) qui entraîne une production d'embryons de mauvaise qualité (Kafi et McGowan, 1997).
- L'effet de la saison sur la réponse de la SOV résulte de l'effet du stress thermique sur la vache (Kafi et McGowan, 1997). Les études menées par Misra (1993) et Ryan et *al.* (1993) indiquent que la réponse de la SOV durant l'été donne lieu à un faible taux de fécondation et de nombre d'ET. Le faible taux de fécondation des ovocytes pendant l'été résulte de l'effet du stress thermique sur la maturation des ovocytes (Sartori et *al.*, 2002). Il semble même que l'efficacité du Folltropin V<sup>®</sup> varie en fonction de la saison. D'après Gonzalez et *al.* (1990), le Folltropin V<sup>®</sup> est plus efficace durant l'hiver et moins efficace durant l'été chez les vaches Brahman.
- L'impact de l'environnement sur l'efficacité de la SOV réside sur l'action du stress environnemental sur la sécrétion des gonadotrophines. Il semble que le transport des vaches durant le traitement de SOV à la FSH donne lieu à un faible taux d'ovulation due à la sécrétion de cortisol (Edwards et *al.*, 1987; Gilad et *al.*, 1993).

### **b. Nombre de SOV précédentes**

En général, la fréquence des suroovulations affecte la réponse ovarienne des vaches. Le taux de fertilisation est négativement affecté par le nombre de suroovulation (Hasler et *al.*, 1983). Le taux passe de 77% (à la première récolte) à 44% après 10 SOV consécutives. Toutefois, les faits sont contradictoires. Il paraît que le nombre de SOV induit une réduction non significative de la réponse (Nelsson et *al.*, 1979; Hasler et *al.*, 1983; Dorn et *al.*, 1991 et Mapletoft et *al.*, 2002).

### **c. Composition, voies d'administration et doses des gonadotrophines**

- Il existe une corrélation positive entre le ratio FSH/LH et la réponse de la SOV. Un faible ratio FSH/LH tend à diminuer la réponse de la SOV (Murphy et *al.*, 1984; Murphy et *al.*, 1991). Un niveau élevé de LH entraîne une activation prématurée de l'ovocyte et affecte, en conséquence, la production des embryons durant la SOV (Moor et *al.*, 1984). Cependant, une quantité de LH (10 à 30% de LH) est indispensable pour la réussite de la SOV. Les résultats des études de Mapletoft et *al.* (2002) montrent qu'un niveau de LH entre 15 à 20 % dans les gonadotrophines utilisés serait la limite acceptable n'affectant pas la réponse de la SOV.
- Les réponses à la SOV à l'aide du Folltropin V<sup>®</sup> ne diffèrent pas selon que le produit est injecté une seule fois en sous cutané ou en im durant 4 jours (Bo et *al.*, 1994). Une dose de FSH inférieure à 200 mg donne lieu à un faible taux d'ovocytes fécondables chez une vache adulte. Il semblerait que l'efficacité de la FSH dépend du site d'injection et en fonction de l'administration de la dose. La réponse à la SOV est plus élevée si l'injection est faite derrière l'épaule (Bo et *al.*, 1994). En outre, le fractionnement de la dose (75% au début et 25% à la fin du traitement) et l'injection en sous cutané d'une dose unique sur un site moins riche en tissus adipeux améliorent la réussite de la SOV (Bo et *al.*, 1994) suggérant que l'allongement de l'effet du produit suite à une faible absorption entraîne une SOV efficient. Par ailleurs, la durée du traitement semble jouer un rôle dans la variation dans la réponse de la SOV. Par exemple, chez les *Bos indicus* une seule injection en sous cutané du Folltropin V<sup>®</sup> donne une réponse élevée par rapport à 2 injections en sous cutané (Bo et *al.*, 1994).
- Lors de la SOV, l'utilisation de la GnRH donne lieu à une faible production d'embryon à cause de l'asynchronie de l'émergence de la vague folliculaire qui résulte en un faible taux de fécondation (Bo et *al.*, 2001).
- La dose d'eCG recommandée varie de 1 500 à 3 000 unités internationale (UI) dont 2 500 doit être injecté en im (Murphy et Martinuk, 1991). Chez la vache, le temps de demi-vie approximative de l'eCG est de 40 heures. En outre, l'eCG peut persister dans la circulation

au delà de 10 jours (Alkemad et *al.*, 1993). Ainsi, une seule injection suffit lors de la SOV à l'aide de l'eCG (Alkemad et *al.*, 1993; Mapletoft et *al.*, 2002). A cause du temps de demi-vie prolongé de l'eCG, la SOV donne lieu à une stimulation prolongée des ovaires, un faible taux d'ovulation, un profil endocrinien anormal et une altération de la qualité des embryons (Mapletoft et *al.*, 2002). Actuellement la SOV à l'aide de l'eCG est devenue rare chez les bovins laitiers bien que la persistance de l'eCG ait été surmontée par l'injection en intraveineuse d'anticorps anti eCG (Mapletoft et *al.*, 2002).

#### **d. Semence**

Il y a une corrélation positive entre la fertilité de la semence utilisée et le taux de fécondation des ovocytes chez les vaches suroovulées (Callaghan et King, 1980). Le taux de fécondation varie de 89% pour une semence dont la fertilité est au dessus de la moyenne, à 70% pour une semence dont la fertilité est en dessous de la moyenne. En outre, la congélation de la semence semble avoir un effet négatif sur la fécondation des ovocytes. La comparaison de 5 semences congelées montre que le pourcentage d'embryons récoltés variait de 32,6 à 84,4% (Misra et *al.*, 1999b). Par ailleurs, il semble que le nombre d'embryons récoltés résulte du nombre de spermatozoïdes contenu dans la semence (Kafi et McGowan, 1997).

#### **e. Nutrition**

La relation entre la nutrition et la reproduction est complexe car la nutrition agit à différents niveaux du système reproducteur (Santos et *al.*, 2008). La nutrition de la donneuse peut influencer la qualité des ovocytes et des embryons récoltés (Santos et *al.*, 2008). La réduction de l'apport alimentaire affecte la croissance folliculaire et contribue, par conséquent, aux variations de la réponse à la SOV (Murphy et *al.*, 1990). La persistance d'une balance énergétique négative postpartum (BEN) favorise la mobilisation des acides gras libres qui, à leur tour, affectent la viabilité des embryons (Leroy et *al.*, 2008). La réponse à une SOV varie en fonction des conditions de chair des donneuses (Baruselli et *al.*, 1999). Une variation du taux d'ovulation de 39,7 à 56,7% résulte de l'augmentation de

la condition de chair de 3,0 à 4,0. Une supplémentation en minéraux et en vitamines de la diète des donneuses serait nécessaire (Vaughan, 1990).

Les effets négatifs d'une suralimentation au moment de l'insémination et pendant le développement embryonnaire est de plus en plus évident et s'expriment par une augmentation du métabolisme des hormones stéroïdiennes au niveau du foie ce qui provoque une diminution de P4 circulante et par conséquent une diminution du développement et de viabilité de l'embryon (Santos et *al.*, 2008). Par exemple, une hyperglycémie chez la vache est associée à la production d'embryons de mauvaise qualité (Gong et *al.*, 2002) alors qu'une hyperinsulinémie et une augmentation de l'insulin like growth factor 1 (IGF-1) affectent le transport de glucose au niveau de l'embryon, et le rend vulnérable à l'apoptose (Armstrong et *al.*, 2002).

#### **f. Méthode de récolte**

Le faible taux de récolte embryonnaire ne résulte pas seulement de la réponse à la SOV. Par exemple, chez les *Buffalo*, le faible taux de récolte peut être attribué au blocage de l'entrée des ovocytes dans l'oviducte (Baruselli, 2006). Il y a 2 méthodes de récolte des embryons; la méthode chirurgicale et non chirurgicale. Cette dernière est la plus utilisée, car elle est répétable, se fait à la ferme et n'affecte pas le tractus reproducteur. Le taux de récolte d'embryon par la méthode non chirurgicale varie selon les études. Kelly et *al.* (1997) et Kim et *al.* (2001) rapportent un taux de récolte élevé qui varie de 60 à 80% tandis que Fricke et *al.* (1994) rapporte un faible taux de récolte aux environs de 20 à 25%. L'absence de la description en détail de techniques utilisées par ces auteurs cités laisse place à plusieurs causes possibles des variations du taux de récolte. Ces variations peuvent être dues aux différences entre les techniques utilisées, l'habilité de la personne et les variations des traitements de SOV. Il est évident qu'il y a des variations dans la technique de récolte non chirurgicale. Selon les études de Sartori et *al.* (2003), le taux de récolte d'embryons varie en fonction de l'endroit où le ballonnet est placé. La pose du ballonnet dans les pointes des cornes donne un taux de récolte de 30,9% tandis que la pose du ballonnet juste après la bifurcation des cornes donne un taux de récolte de 60,3%.

### III. Environnement utérin comme facteur de variation de la réponse à la SOV

#### A. Importance du milieu utérin

La rencontre de l'ovocyte et des spermatozoïdes se déroule dans l'oviducte. La réussite de la fertilisation et du développement de l'embryon dépend de l'environnement utérin auquel l'ovocyte et les spermatozoïdes ont été exposés. Après 3 à 4 jours de séjour dans l'oviducte, l'embryon accède à l'utérus pour initier son implantation aux environs de la période entre le 18<sup>ème</sup> et 30<sup>ème</sup> jour (Kimura, 2005 et Bauersachs et *al.*, 2006). Avant l'implantation, l'embryon est libre dans la cavité utérine dans laquelle sa croissance et sa survie dépend de l'environnement et des nutriments fournis par les sécrétions de l'oviducte et de l'utérus (Ellington, 1991; Bavister, 2000).

Peu d'études ont été faites sur l'analyse des effets des sécrétions de l'utérus et de l'oviducte sur la fécondation et le développement embryonnaire chez les vaches suroovulées bien que l'importance de ses sécrétions sur le transport des gamètes, la croissance et la survie de l'embryon chez la vache à une ovulation unique a été rapportée (Bavister, 2000). La plupart des études sur l'analyse des sécrétions de l'oviducte et de l'utérus sont axées sur la quantification des protéines, des substrats énergétiques, de l'urée, du pH, des lipides et des ions à différents stades du cycle œstral (Hugentobler et *al.*, 2007). Jusqu'à présent, il n'y a pas de valeur de référence sur les composants des sécrétions utérines du fait de l'absence d'une méthode de référence de récolte du liquide utérin.

Chez les vaches à une seule ovulation, le milieu utérin contribue à la survie de l'embryon durant ses premiers jours de séjour dans l'utérus (Albiñ et *al.*, 1991). Les modifications, même mineures, du milieu utérin durant cette période peuvent affecter le développement des embryons voire diminuer leur survie (Barnes, 2000). Des changements de plusieurs origines, alimentaires, métaboliques, hormonales et immunologiques, peuvent modifier la composition des sécrétions utérines et, par conséquent, affecter la croissance et de la survie des embryons.

## B. Bactériologie et cytologie du milieu utérin

La contamination bactérienne (Tableau 1) de l'utérus et la persistance des bactéries pathogènes dans l'utérus après la mise bas entraînent des infections utérines, une des principales causes d'infertilité chez la vache (Sheldon et *al.*, 2004). La présence des bactéries pathogènes dans l'utérus engendre une inflammation et lésions de l'endomètre, un retard de l'involution utérine et affecte négativement la survie de l'embryon (Bonnett et *al.*, 1991; Sheldon et *al.*, 2003). L'infection bactérienne, les toxines sécrétées par les bactéries ainsi que l'inflammation utérine perturbent les fonctions ovariennes et la croissance folliculaire, inhibent la sécrétion de LH par l'hypophyse ainsi que l'ovulation (Opsomer et *al.*, 2000; Sheldon et *al.*, 2002). C'est pourquoi, les infections utérines est l'une des principales causes du faible taux de conception, de l'augmentation de l'intervalle vêlage-vêlage et de la réforme des vaches (Borsberry et *al.*, 1989; Leblanc et *al.*, 2002). Bien que la plupart des vaches sont capables d'éliminer les bactéries présentes dans l'utérus durant les 5 premières semaines postpartum, 10 à 17 % des vaches présentent des infections bactériennes génératrices d'infections utérines (Semambo et *al.*, 1991) qui peuvent être classifiés en métrites, endométrites cliniques et subclinique et pyomètre (Sheldon et *al.*, 2006).

La contamination bactérienne de l'utérus postpartum n'est pas obligatoirement associée à une infection utérine bien que la plupart des infections utérines postpartum débute avec une contamination bactérienne de l'utérus. Le développement d'une infection utérine dépend du statut immunitaire de la vache aussi bien que la nature et du nombre de bactéries présentes dans l'utérus (Tableau 1; Sheldon et *al.*, 2004). L'établissement d'une infection bactérienne peut aussi dépendre du statut endocrinien de l'utérus. Il semblerait que la P4 favorise la sécrétion de stéroïdes responsable de l'inhibition de l'afflux de neutrophiles vers l'utérus par contre, le mécanisme d'action précis reste encore à élucider. Il paraît que la formation d'un CJ postpartum associée à une production de P4 précède le début des infections utérines (Hansen et *al.*, 2004). L'infusion intra-utérine postpartum d'*Arcanobacterium pyogenes* et d'*Escherichia coli* dans des conditions expérimentales ne génère pas d'infection utérine tant que la concentration plasmatique de P4 reste basse (Del Vecchio et *al.*, 1992). Cependant, les vaches avec des ovulations dans les trois premières

semaines postpartum, développent des infections utérine spontanées à cause de P4 (Savio et al., 1990; Sheldon et al., 2002).

**Tableau 1** : Bactéries pouvant être isolées dans l'utérus (William et al., 2005)

Germes pathogènes (1)	Germes pathogènes potentiels (2)	Germes contaminants ou opportunistes (3)
- <i>Arcanobacterium pyogenès</i>	- <i>Bacillus licheniformis</i>	- <i>Clostridium perfringens</i>
- <i>Fusobacterium nécrophorum</i>	- <i>Enterococcus faecalis</i>	- <i>Klebsiella pneumoniae</i>
- <i>Escherichia coli</i>	- <i>Manheimia haemolytica</i>	- <i>Micrococcus spp</i>
- <i>Pasteurella melaminogenicus</i>	- <i>Pasteurella multocida</i>	- <i>Providencia stuartii</i>
	- <i>Peptostreptococcus spp</i>	- <i>Proteus spp</i>
	- <i>Staphylococcus aureus</i>	- <i>Staphylococcus spp</i>
	- <i>Non-haemolytic streptococci</i>	- <i>A-haemolytic streptococci</i>
		- <i>Streptococcus acidominimus</i>
		- <i>Aspergillus spp</i>

(1) Bactéries reconnues responsables de lésions endométriales.

(2) Bactéries qui peuvent être isolées lors d'une endométrite et sont généralement non associées à des lésions endométriales.

(3) Bactéries isolées dans l'utérus en absence d'inflammation utérine

Le diagnostic des infections utérines devrait être fait le plus précocément possible car il conditionne la mise en place de traitement approprié et le pronostic de la fertilité future de la vache. Malheureusement, il n'y a pas de test standard de diagnostic des infections utérines (Sheldon et al., 2006). Cependant il y a, en général, 3 approches standard :

- **bactériologie des sécrétions utérines** : en faisant une culture en aérobie ou anaérobie à partir d'un écouvillon ou d'un lavage utérin



- **examen clinique** : à l'aide d'une palpation transrectale, d'une échographie de l'utérus ou d'une vaginoscopie en vue de déceler des adhérences, la présence de liquide intra-utérin ou catégoriser les sécrétions vaginales.

- **cytologie endométriale** : permet de quantifier la réaction inflammatoire de l'utérus à la suite d'une infection bactérienne. La cytologie peut être faite à l'aide de prélèvement fait avec une cytobrosse introduite directement dans l'utérus ou dans le liquide du lavage fait selon la méthode de récolte d'embryons non-chirurgicale (Kasimanickam et al., 2004). L'examen cytologique consiste à compter le nombre de polymorphonucléaire (PMN) par rapport aux cellules totales du frottis. Le résultat (% de PMN) permet d'avoir une appréciation de l'état de la réaction inflammatoire de l'utérus. Selon Kasimanickam et al. (2004), un pourcentage de  $PMN \geq 18\%$  entre 20 à 33 jours postpartum et  $PMN \geq 10\%$  entre 34 à 47 jours postpartum est un indicateur d'endométrite subclinique qui est associée à des performances reproductrices réduites de 41% et 44% respectivement.

## C. Composantes des sécrétions utérines

### 1. Glucose

Le glucose est une molécule indispensable durant la maturation de l'ovocyte. Métabolisé par la voie des pentoses, le glucose sert de substrat à l'ovocyte pour la production d'ATP qui est indispensable à la croissance et à la capacitation de l'ovocyte (Cetica et al., 2002; Sutton-McDowall et al., 2003).

Bien qu'il n'y a pas d'association entre la concentration utérine et sanguine de glucose (Lamothe et al., 1972; Hugentobler et al., 2008), il semble que la concentration en glucose intra-utérine serait toujours supérieure à celle du plasma du fait de la présence d'activité enzymatique des cellules endométriales (Bousquet et al., 1976a). En outre, la concentration du glucose dans le liquide folliculaire dépend du statut nutritionnel (Landau et al., 2000).

Comme, dans l'ovocyte, le glucose constitue le principal substrat énergétique utilisé par l'embryon. Aussi métabolisé par la voie des pentoses, le glucose est transformé en pyruvate et lactate pour assurer le métabolisme énergétique, le développement et éventuellement la survie de l'embryon. Toutefois, le mécanisme par lequel le glucose affecte le développement de l'embryon n'est pas encore clair. Il y a un désaccord entre les auteurs

quand à l'association entre la concentration du glucose et la qualité des embryons. Hugentobler et *al.* (2008) affirme l'absence de l'association entre la concentration de glucose et la qualité des embryons contrairement à Krisher et Bavister (1998); Sutton-McDowall et *al.* (2004) qui rapporte le rôle joué par le glucose *in vitro* (4 à 5 mM) sur l'expansion du cumulus et la maturation nucléaire de l'ovocyte l'accélération le clivage de l'embryon au stade de blastocyste (Matsuyama et *al.*, 1993). Selon les études *in vitro*, l'effet du glucose sur le développement embryonnaire varie en fonction de sa concentration. A faible concentration (0.188 mM), le glucose favorise le taux de clivage des embryons au stade de blastocyste tandis qu'à concentration élevée (3 à 5 mM), le glucose inhibe le développement des blastocystes (Matsuyama et *al.*, 1993). Koji et *al.* (1997) et Donnay et *al.* (2002) rapportent qu'une concentration de glucose variant entre 1.5 à 5.5 mM favorise la production de blastocyste.

## 2. Urée

Chez les vaches laitières, l'augmentation de la concentration sanguine de l'urée résulte de l'utilisation de diètes riches en protéines dégradables (Butler et *al.*, 1996; Ferguson et *al.*, 1993). Une augmentation de la concentration de l'urée a été associée à une réduction de la fertilité des vaches (Canfield et *al.*, 1990; Sinclair et *al.*, 2000) à cause des effets toxiques de l'urée sur l'ovocyte et ou l'embryon. Cependant, l'association entre l'augmentation de la concentration de l'urée et la détérioration de la fertilité des vaches laitières reste encore à élucider.

Chez les vaches en lactation, le faible taux de fertilisation, la mauvaise qualité et le faible taux de développement des embryons sont associés à l'augmentation de la concentration circulante de l'urée (Butler, 1998). Une concentration élevée de l'urée dans l'oviducte et dans le milieu utérin ( $267 \pm 18$  nM/mL) influence la viabilité de l'embryon (Sinclair et *al.*, 2000). *In vivo*, l'augmentation de la concentration plasmatique de l'urée perturbe l'action de la P4 sur le microenvironnement utérin en le rendant hostile au développement de l'embryon (Butler, 2000). L'augmentation de l'urée (jusqu'à  $16.6 \pm 1.3$  mg/dL) induit une diminution du pH utérin (de  $7.08 \pm 0.07$  à  $6.88 \pm 0.08$ ) (Elrod et *al.*, 1993; Butler et *al.*,

1998; Rhoads et *al.*, 2004) et résulte en la perturbation de la composition en ions (phosphore, potassium, chlorures et magnésium) de l'utérus.

*In vitro*, une concentration excessive d'urée entraîne une sécrétion élevée de PGF 2 $\alpha$  par les cellules endométriales bovine (Butler, 1998) et entraîne une perturbation du développement de l'embryon (Sinclair et *al.*, 2000; Ocon et *al.*, 2003). Cependant, même si la concentration élevée de l'urée n'affecte pas le clivage de l'œuf, il semble que l'urée (5 à 7 mM) a un effet négatif sur le développement des blastocystes (Ocon et *al.*, 2003).

*In vivo*, les auteurs sont en désaccord sur l'effet de l'augmentation de l'urée sur la réponse à la SOV. Garcia-Bojalil et *al.* (1994) conclue l'absence de l'effet négatif de l'urée sur le nombre et la croissance des follicules ainsi que le nombre d'embryons chez les vaches suroovulées nourries à l'aide d'une diète riche en urée. Tandis que Gatt et *al.* (1999) et Rhoads et *al.* (2006) concluent l'existence des effets négatifs de l'urée (à partir de  $25.2 \pm 1.5$  mg/dl) sur le nombre, la qualité et le stade de développement des embryons.

### 3. LDH

La LDH peut être utilisé comme indicateur de viabilité de l'embryon (Johnson et *al.*, 1991). En effet, la LDH joue un rôle important durant le métabolisme énergétique de l'embryon, car elle métabolise le glucose en anaérobie et transforme le pyruvate en lactate (Bassett, 1991). De plus, elle stimule le métabolisme du blastocyste. Cette enzyme est spécialement importante, car elle sert de substrat pour la synthèse du lactate et assure l'apport énergétique durant le développement et la croissance de l'embryon. Elle est indispensable à la sécrétion du liquide utérine et lors de l'implantation de l'embryon (Bousquet et *al.*, 1976). Une concentration élevée de LDH dans le milieu de culture *in vitro* d'embryons témoigne une viabilité des embryons (Johnson et *al.*, 1991).

### 4. Électrolytes

Les sécrétions du microenvironnement utérin résultent des mouvements des électrolytes excrétés par les cellules épithéliales de l'oviducte et de l'utérus (Gott et *al.*, 1988). Les électrolytes contenus dans les sécrétions de l'oviducte et de l'utérus jouent un rôle important dans la régulation des activités enzymatiques et du pH des sécrétions de

l’oviducte et de l’utérus (Leese, 1995). De plus, ils jouent un rôle dans le processus de maturation de l’ovocyte et des spermatozoïdes (Grippio et *al.*, 1991), de fertilisation ainsi que le maintien de l’homéostasie et la régulation du métabolisme durant le développement de l’embryon (Leese, 1988; Bavister, 2000). Toutefois, leurs effets sur le développement et la survie de l’embryon sont plus ou moins connus. D’après Hugentobler et *al.* (2007b), les électrolytes mesurables dans les sécrétions de l’oviducte et de l’utérus sont le magnésium (Mg), le potassium (K), les bicarbonates ( $\text{HCO}_3^-$ ), le sodium (Na), le sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), le phosphore (P), le chlore (Cl) et le zinc (Zn).

#### **a. Mg**

Le Mg joue un rôle de coenzyme dans le métabolisme du glucose. *In vitro*, le taux de développement de l’embryon varie en fonction de la concentration de Mg (Hisataka et *al.*, 2004). À faible concentration, le Mg (0.5 mM) entraîne un retard de développement de l’embryon et des malformations tandis qu’à concentration élevée (2 mM), il accélère la maturation nucléaire et le taux de développement des blastocystes (Hisataka et *al.*, 2004).

#### **b. Na et Cl**

Les sécrétions de l’oviducte et de l’utérus se composent en majeure partie par les ions Na et Cl. Ces 2 électrolytes jouent un rôle important dans le processus de développement de l’embryon (Hugentobler et *al.*, 2007b). Il paraît que le Cl joue un rôle important dans l’accumulation de liquide et à la formation du blastocœle tandis que Na/K contrôle l’accumulation du liquide dans le blastocyste (Watson et Barcroft, 2001) et la formation des *tight junction* durant l’expansion du blastocyste (Violette et *al.*, 2006).

#### **c. $\text{HCO}_3^-$**

Le maintien du pH utérin est l’une des conditions essentielles au maintien de l’homéostasie de l’embryon. L’acidification du pH utérin (à partir de 6.4) affecte le développement de l’embryon (Elrod et *al.*, 1997) tandis que l’alcalinisation lui confère une résistance. Il semble que cette résistance est jouée par la présence d’un échangeur  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}$

au niveau de l'embryon (Ménézo, 1985). Le  $\text{HCO}_3^-$  joue un rôle dans la protection de l'embryon contre les stress alcalins.

#### **d. K et P**

Des concentrations élevées de K et P utérine ont été associées à la production d'embryons anormaux (Wiebold, 1988). Le P est indispensable à la synthèse des membranes nucléaires. Cependant son effet sur le développement de l'embryon demeure non élucidé. Le K est indispensable à la fécondation et au développement de l'embryon. De plus, le K intervient dans la modification des membranes du blastocyste et de l'épithélium utérin au moment de l'implantation de l'embryon (Hugentobler et *al.*, 2007b). *In vitro*, une concentration élevée de K (6 mM) réduit le taux de développement des blastocystes (Willey et *al.*, 1986). *In vivo*, il y a une association positive entre une concentration élevée de K ( $33 \pm 6 \mu\text{g/mL}$ ) dans le liquide de lavage utérin et les embryons anormaux récoltés 7 jours après une SOV (Wiebold, 1988).

### **5. Lipides et acides gras**

Les triglycérides (TG) présents dans les ovocytes représentent 50% du matériel lipidique de l'ovocyte tandis que les acides gras les plus abondants sont l'acide palmitique, stéarique et linoléique (Kim et *al.*, 2001).

Le rôle des lipides est mal connu, mais il semble jouer le rôle de carburant et de régulateur durant la maturation de l'ovocyte (Leese, 2002). De plus, il paraît que ces lipides servent à la synthèse des membranes de l'embryon. *In vitro*, une concentration élevée de TG retarde la maturation de l'ovocyte en augmentant la proportion des cumulus apoptotiques (Fergusson et Leese, 1999; Leroy et *al.*, 2008) tandis que la présence d'inhibiteur de la synthèse de cholestérol semble bloquer la transition de l'embryon au stade de blastocyste (Thibault et Levasseur, 2001; Leroy et *al.*, 2008). Toutefois le mécanisme d'action des effets négatifs sus cités restent encore à élucider.

## 6. Protéines

La concentration de protéines contenues dans les sécrétions de l'oviducte et de l'utérus représente 10 à 15% des protéines du sérum (Leese, 1988). Ces protéines proviennent du sang et des cellules épithéliales de l'oviducte et de l'utérus. L'albumine, la transferrine et l'immunoglobuline G représente 95% des protéines retrouvées dans les sécrétions de l'oviducte et de l'utérus (Oliphant et *al.*, 1978; Thibault et Levasseur, 2001). Des glycoprotéines spécifiques de l'oviducte (GSO) ont été identifiées chez la vache, elles ont été retrouvées dans le cytoplasme de l'ovocyte et dans la zone pellucide (Gandolfi et *al.*, 1991; Abe et *al.*, 1995a et Starros et Killian, 1998). Cependant leurs actions biologiques n'ont pas été démontrées.

Il semblerait que ces protéines jouent des rôles dans la capacitation des spermatozoïdes (McNutt et *al.*, 1992), la fertilisation et le développement des embryons (Guerrin et Menezo, 1995).

## 7. Hormones stéroïdiennes

Les hormones stéroïdiennes jouent un rôle important dans la sécrétion des fluides de l'oviducte et de l'utérus en modulant les mouvements des ions. Chez la vache, l'E2 améliore la maturation complète de l'ovocyte (Fukushima et Fukui, 1985) tandis que la P4 influence l'environnement utérin et le développement de l'embryon (Green et *al.*, 2005).

L'E2 joue un rôle dans la production des sécrétions de l'oviducte et de l'utérus (Spencer et Bazer, 1995). Peu d'études ont été faites sur l'analyse des effets *in vivo* de l'E2 sur la maturation des follicules et le développement embryonnaire. La plupart des études rapportées ont été faites *in vitro*. L'addition d'E2 *in vitro* accélère la maturation des ovocytes (Younis et *al.*, 1989). Cependant, les résultats des études de Beker et *al.* (2002) et de Beker-Van Woudenberg et *al.* (2004), rapportent qu'une exposition prolongée de l'ovocyte à l'E2 (3.67  $\mu$ M) durant 8 heures entraîne une régression de l'expansion du cumulus et affecte négativement la maturation nucléaire de l'ovocyte. L'E2 stoppe la croissance de la follicule au stade de métaphase I accompagné d'une déformation du fuseau nucléaire. En outre, elle semble retarder le clivage de l'embryon au stade de blastocyste (Gliedt et *al.*, 1996).

La P4 est l'hormone principale qui contrôle l'environnement utérin. Elle stimule l'endomètre à sécréter des facteurs de croissances, des nutriments, des ions et des enzymes essentiels au développement de l'embryon (Graham et Clarke, 1997). Chez la vache, la P4 est indispensable au maintien de la gestation et au développement de l'embryon en inhibant la lyse du CJ et en favorisant la sécrétion de l'interferon tau (IFN- $\tau$ ) (Mann et Lamming, 2001). Il semble même qu'une faible concentration ( $<1$  ng/mL) de P4 3 à 8 jours de gestation entraîne un faible taux de développement de l'embryon (Mann et *al.*, 1999; 2001). La relâche postovulatoire de la P4 serait une condition essentielle au développement de l'embryon au début de la gestation tandis qu'une supplémentation exogène (CIDR contenant 0.95 g de P4) de P4 durant la première semaine de gestation entraîne une accélération du développement de l'embryon (Mann et *al.*, 2006). Par contre, un retard de développement de l'embryon (Walton et *al.*, 1990) et un échec de la gestation (Mann et *al.*, 1999) ont été rapportée comme étant résultantes d'une faible concentration ( $6.1 \pm 0.4$  ng/mL) circulante de P4 durant la phase lutéale (Mann et Lamming, 2001).

## **8. Prostaglandines (PGE 2 et PGF 2 $\alpha$ )**

### **a. PGE 2**

La PGE 2 est un des composants majeurs des sécrétions de l'endomètre des ruminants (Salamosen et *al.*, 1990). Contrairement à la PGF 2 $\alpha$ , la PGE 2 a une action anti-lutéolytique (Milave et *al.*, 1996). En outre, la PGE 2 est indispensable lors de la réorganisation de l'endomètre avant l'implantation. La PGE 2 est impliquée dans le contrôle de la croissance, de la différenciation et des fonctions des cellules endométriales en inhibant la relâche de la PGF 2 $\alpha$  (Hunt et *al.*, 1996). En outre, il semblerait que la PGE 2 inhibe la lutéolyse précoce et intervient dans la régulation des fonctions utérines durant le début et la moitié du cycle œstral ainsi qu'au début de la gestation (Murakami et *al.*, 2001).

### **b. PGF 2 $\alpha$**

La PGF 2 $\alpha$  est sécrétée de façon pulsatile, suivant une série de pulse de courte durée pendant 2 à 3 jours après la lutéolyse (Kindhal et *al.*, 1981), au niveau des régions inter-

caronculeuses de la surface de l'épithélium de l'endomètre (Skarzynski et *al.*, 2000). *In vitro*, la sécrétion varie en fonction du stade du cycle œstral avec un maximum durant la phase folliculaire et pendant l'œstrus ( $398 \pm 23$  à  $639 \pm 21$  ng/mL) (Miyamoto et *al.*, 2000). La PGF  $2\alpha$  joue un rôle clé dans la régulation du processus de reproduction incluant l'ovulation (Sirois et *al.*, 2004) et la lutéolyse (Poyser, 1995), un événement clé dans la régulation de la fertilité et le processus de reproduction car elle conditionne la cyclicité et la fertilité de la vache. Autrement dit, la PGF  $2\alpha$  est le déterminant du début d'un nouveau cycle et le développement du follicule ovulatoire (McCracken et *al.*, 1999).

La mesure de la PGF  $2\alpha$  se fait par la quantification de son métabolite 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F $2\alpha$  (PGFM). Une augmentation de la PGFM plasmatique reflète l'augmentation de la PGF  $2\alpha$  intra utérine (Skarzynski et Okuda, 2000). Une augmentation de PGF  $2\alpha$  allant jusqu'à 80 ng/mL a été rapportée durant les périodes de stress (Malayer et *al.*, 1999), les manipulations utérines (Wann et Randel, 1990), les infections utérines (Mateus et *al.*, 2003), ainsi que les mammites (Hockett et *al.*, 2000). Bien que le mécanisme d'action de la PGF  $2\alpha$  sur le développement de l'embryon reste encore à élucider, il paraît qu'il y a une relation négative entre une concentration élevée de PGF  $2\alpha$  intra utérine et le développement de l'embryon au début de la gestation. Il y a une relation négative entre la concentration de PGF  $2\alpha$  intra utérine et la qualité des embryons (Schrick et *al.*, 1993). Une injection de 15 mg PGF  $2\alpha$  5 à 8 jours après l'insémination induit une diminution du taux de développement des embryons et du taux de gestation (Lemaster et *al.*, 1999; Hockett et *al.*, 2004). *In vivo*, une concentration de PGF  $2\alpha$  égale à  $136.4 \pm 32.1$  pg/mL affecte négativement la compaction de l'embryon au stade de morula en altérant les *gap junctions* et les molécules d'adhésion cellulaire (Hockett et *al.*, 2004). En outre, elle induit une altération des gènes de transcriptions durant le développement embryonnaire, aboutissant à une apoptose et éventuellement la mort de l'embryon. Par ailleurs, la PGF  $2\alpha$  diminue la capacité des embryons au stade de 16 à 32 cellules de passer au stade de blastocyste en inhibant l'interaction, la différenciation et la croissance des cellules de l'embryon (Scenna et *al.*, 2004).



## 9. Facteurs de croissance

Il a été démontré que les facteurs de croissance (FC) jouent un rôle dans la régulation des fonctions de l'ovaire et de l'utérus. Les FC sont impliqués aussi bien dans le processus de reproduction que dans le développement embryonnaire avec la sécrétion de P4 et d'E2, la différenciation des cellules endométriales et la croissance du trophoblaste (Simmen et Simmen, 1991). Chez la vache, plusieurs FC dont l'insuline, human recombinant IGF-1 et IGF-2, des protéines de liaison (IGFBP1 à IGFBP6) et de *Transforming growth factor* (TGF) sont présentes dans les tissus et les sécrétions de l'utérus (Winger et *al.*, 1997). L'insulin-like growth factor 1 (IGF-1) a été rapporté comme étant le GF le plus important. Il contrôle à la fois, l'action de P4 et de l'E2 au niveau de l'utérus (Murphy et Ballejo, 1994), la régulation des sécrétions de l'oviducte et de l'utérus, la croissance et la maturation folliculaire ainsi que le développement de l'embryon (Fortune, 2003; Webb et *al.*, 2004). En outre, il semble jouer un rôle essentiel dans l'interaction entre l'utérus et l'embryon en agissant sur la production de l'IFN- $\tau$  (Simmen et *al.*, 1993).

### a. Effets de l'IGF-1 sur la croissance folliculaire et la qualité de l'ovocyte

Des études *in vitro* montrent que l'IGF-1 avec la FSH contrôle la production d'aromatase (Spicer et *al.*, 2002), de follistatine, d'inhibine A et d'activine A au niveau des cellules de la granulosa (Glister et *al.*, 2006) conférant une protection de l'ovocyte contre l'apoptose qui peut survenir durant le stade d'activation de la caspase (Wasielak et Bogacki, 2007). Cependant, le mécanisme d'action de l'IGF-1 sur l'inhibition de l'apoptose reste encore à élucider. *In vitro*, l'IGF-1 à 10 ng/ $\mu$ L induit l'expansion du cumulus de l'ovocyte, améliore la maturation nucléaire et le métabolisme de la pyruvate de l'ovocyte (Stefanello et *al.*, 2006).

Chez les vaches suroovulées, la croissance et la maturation des follicules varient considérablement et résulte en une variation du moment de leur ovulation (D'Occhio et *al.*, 1999). La SOV avec la FSH induit une augmentation de la concentration intra-folliculaire de l'IGF-1 qui améliore la croissance des follicules de 3 mm de diamètre au moment de la

SOV (Sakaguchi et *al.*, 2000) en accélérant la mitose des follicules en augmentant les activités de *M-phase promoting factor* (MPF) et *mitogen-activated protein* (MAP) kinase durant la phase finale leur maturation (Sakaguchi et *al.*, 2002).

#### **b. Effets de l'IGF-1 sur le développement de l'embryon**

L'IGF-1 est sécrété au niveau de l'utérus (Winger et *al.*, 1997; Pushpakamura et *al.*, 2002). Des quantités d'IGF-1 paracrine et endocrine agissent directement sur l'embryon ou indirectement en modulant les mouvements des ions des sécrétions de l'oviducte et de l'utérus (Wathes et *al.*, 2003; Velazquez et *al.*, 2008b). Les effets directs de l'IGF-1 sur la viabilité de l'embryon *in vivo* n'ont pas été démontrés. Par contre, *in vitro*, 10 à 200 ng/ml d'IGF-1 inhibe la proportion des blastomère apoptotiques de l'embryon (Stefanello et *al.*, 2006), favorise la croissance des cellules de l'embryon (Makarevich et Markkula, 2002) et accélère le développement de l'embryon au stade de blastocyste (Block, 2007; Block et Hansen, 2007). Cependant, bien que l'IGF-1 augmente la capacité de l'embryon à se développer, il semble qu'il peut altérer l'expression de plusieurs gènes de transcription pouvant être indispensable au développement et à la survie de l'embryon (Block et *al.*, 2008).

## **Hypothèse et objectifs de recherche**

### **I. Hypothèse**

La survie des embryons dépend de l'environnement et des nutriments fournis par les sécrétions de l'utérus et de l'oviducte (Bavister, 2000). D'après Killian (2004) et Sirard et *al.* (2006) la croissance des follicules, la qualité des ovocytes et le développement des embryons peuvent être affectés par la SOV. Par déduction, le traitement de SOV induirait des changements des sécrétions utérines qui affecteraient le nombre et le développement normal des embryons.

### **II. Objectifs**

Les objectifs de la présente étude sont de :

- (1) déterminer l'effet de la SOV sur la bactériologie et la cytologie utérine et leurs effets sur le nombre d'ET
- (2) déterminer l'effet de la SOV sur les paramètres biochimiques sérique et utérin, au jour 7 du cycle œstral (J7) et au jour de la récolte des embryons (JR) et leurs effets sur le nombre d'ET.

## PRÉSENTATION DE L'ARTICLE

**Title:** Relationship between uterine and serum biochemical parameters and transferable embryos following superovulation in Holstein dairy cows

**Authors :** Hasina Santatriniaina Rasolomboahanginjatovo <sup>\*</sup>, Younès Chorfi<sup>\*</sup>, Raynald Dupras<sup>†</sup>, Louis Mills<sup>†</sup>, Réjean Lefebvre<sup>‡</sup>

<sup>\*</sup> Département de Biomédecine Vétérinaire, Faculté de médecine vétérinaire – Université de Montréal (3200, rue Sicotte, CP 5000, Saint-Hyacinthe, QC, J2S 7C6, Canada)

<sup>†</sup> E.R.D Inc.

<sup>‡</sup> Centre de recherche en reproduction animale (CRRA) and Département de Sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire – Université de Montréal (3200, rue Sicotte, CP 5000, Saint-Hyacinthe, QC, J2S 7C6, Canada)

**Corresponding author:** Younès Chorfi, Fax: 450-778-8109

## Abstract

An adequate uterine environment is essential to embryo survival and could affect the number of transferable embryos (TE) in superovulated cow. The objectives of this study were to determine the effect of SOV on uterine bacteriology and cytology, on serum and uterine biochemical parameters and consequently on the number of TE. Non-lactating (n=7, group I) and lactating (n=28, group II) Holstein cows were respectively synchronized for estrus and superovulated and both inseminated. Uterine bacteriology and cytology and uterine and serum PGFM, IGF-1, urea, TP, LDH, Glu, P4, E17 $\beta$ , Ck, Cl, and K were measured at day 7 of estrous cycle (D7, starting day of the SOV protocol) and at the designated day of embryo recovery (DER). Harvested embryos were evaluated according to IETS's criteria. Superovulated cows produced an average of  $7.39 \pm 6.22$  oocytes/embryos of which  $3.32 \pm 4.81$  were transferable embryos (TE). There was no significant variation of uterine bacteriology and cytology between D7 and DER within the two groups. Serum urea, E2; uterine Glu, Ck, LDH, TP, P4, PGFM in group I and serum P4, PGFM; uterine LDH, PGFM in group II were significantly higher ( $P<0.01$ ) at DER than at D7. At DER, group I was different ( $P<0.01$ ) to group II's uterine and serum urea, LDH, PGFM, serum P4, uterine TP. There was no association between uterine bacteriology and cytology and number of TE. However, TE was positively correlated with serum IGF-1 at D7 ( $r=0.45$ ;  $P=0.001$ ) and P4 at DER ( $r=0.43$ ;  $P<0.05$ ) and negatively correlated with both serum and uterine PGFM respectively at D7 ( $r=-0.54$ ;  $P<0.005$  and  $r=-0.67$ ;  $P<0.001$ ) and DER ( $r=-0.48$ ;  $P<0.01$  and  $r=-0.57$ ;  $P<0.002$ ). The present results infer that changes following SOV in both serum and uterine secretion may affect the number of TE.

**Key words :** Superovulation, uterine and serum biochemical parameters, transferable embryos, Holstein dairy cows

## I. Introduction

The goal of superovulation (SOV) in cattle is the production of an optimum number of transferable embryos (TE) capable of establishing pregnancy after transfer and delivering healthy offspring. However, there are multiple constraints on the success of SOV in dairy cattle. The most obvious constraint is the high unpredictability of the number of TE (Singh *et al.*, 2004). De Roover *et al.* (2005) reported a great variability in both the superovulatory response and embryos quality. Despite the considerable progress in the understanding of ovarian follicular growth and its clinical applications on control of follicular waves (Mapletoft *et al.*, 2002), donor cows still fail to produce a consistent number of TE.

Variability in ovarian response has been related to the inconsistent results in SOV treatment, such as gonadotropin preparation, batch and total dose, duration and timing of treatment and the use of additional hormones in the superovulatory scheme (Mapletoft *et al.*, 2002). Moreover, other factors such as ovarian status and number of small follicle at the time of SOV (Cushman *et al.*, 1999), presence or absence of dominant follicle (Kim *et al.*, 2001), reproductive history, nutritional status (Santos *et al.*, 2008) and repeated SOV (Benyei *et al.*, 2004) have been also reported as important source of variations of SOV response.

In cattle, the embryo moves from the oviduct into the uterus 4 days after fertilisation and remains relatively free-floating up until implantation around day 20 (Schillo, 2009). Uterine environment contributes to embryo survival during its first few days of life (Albihn *et al.*, 1991). During this period, the embryo is dependent on the nutrients provided by the oviduct and the uterine fluid for its growth and survival (Bavister, 2000). Thus, uterine environment could be considered as a determining factor in embryo development and survival and eventually, affects the number of TE.

To date, there is little published information on the effect of uterine secretions during *in vivo* embryo production in superovulated cattle. Because the contribution of uterine environment is essential for embryo growth and survival in single-ovulated cattle, this condition should also be valid for superovulated cows. Deviation from normal uterine compartments might be detrimental to the development and survival of the embryos (Barnes, 2000). Oviduct and uterus environments affect directly the quality of the recovered

embryos after SOV (Killian, 2004). Thus, SOV treatment can potentially induce uterine changes that could contribute to the variations in the number TE. Therefore the aims of the present study were to determine the effect of SOV on uterine bacteriology and cytology, on serum and uterine biochemical parameters and consequently on the number of TE.

## **II. Materials and Methods**

### **A. Animals**

Animal care procedures followed the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (CCAC) and the protocol was approved by the Animal care committee of the Faculté de médecine vétérinaire of the Université de Montréal. Thirty-five Holstein cows clinically healthy, housed indoor with free access to fresh water were used. All cows were at day 7 of estrous cycle (D7, starting day of SOV protocol), had normal reproductive tract and corpus luteum (CL) on transrectal palpation and showed no uterine discharge at visual inspection and vaginoscopy. Cows were divided into group I, a group of 7 single-ovulated non-lactating dairy cows from the dairy herd of the Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, aged of 3 to 6 years old with body condition scores ranging from 2.5 to 3.5 (scale 1.0 to 5.0; Edmonson *et al.*, 1989), and group II, a group of 28 superovulated lactating cows from a private farm in St Liboire, Qc. Canada, between 80 and 185 days in milk (DIM) aged of 2 to 6 years old with body condition scores ranged from 2.5 to 3, milked twice daily and fed with a total mixed ration (Table 1).

### **B. Experimental design**

Cows in group I were synchronized with two injections of cloprostenol (2 mg, i.m), a PGF  $2\alpha$  analogue (Estrumate, Shering-Plough, Pointe-Claire, Québec, Canada) and inseminated twice at estrus while cows in group II were superovulated and inseminated twice. All cows were assigned to convenient sampling consisted of uterine lavage and blood collection at D7 and day of embryo recovery (DER).

#### **1. Superovulation protocol**

At D7 (day 0 of SOV), cows received 3.5 mg of estradiol-17 $\beta$  i.m and intravaginal progesterone implants containing 1.39 g of progesterone (CIDR, Pfizer Canada Inc,

Kirkland, Qc) in order to synchronize the emergence of a new follicular wave at the time of SOV. From day 4 to day 8, cows received a total of 380 mg NIH-FSH-P1 (Folltropin® - V, Bioniche Animal Health, Belleville, On., Canada) administered i.m through nine injections of decreasing dose (from 70 mg to 20 mg) at 12-h intervals. On day 7, cows received two injections of cloprostenol (2 mg, i.m) at 12-h intervals to regress the CL. On day 8, the CIDR was removed at the time of the last injection of FSH. On day 9, a total dose of 150 µg GnRH (Cystorelin, Merial Canada Inc, Baie d'Urfe, Qc., Canada) administered i.m through two injections at 12-h intervals were given to induce ovulation. Two AI were performed; the first was performed on day 9 at the time of the second injection of GnRH and the second was done on day 10, 12 h after first AI.

## **2. Embryo recovery**

Embryos were recovered 7 days after AI. An epidural anesthesia was administered using 5 ml of Lidocaine® Hcl 2% (Bimeda-MTC, Cambridge, On., Canada). The number of CL was estimated just prior to collection using an ultrasound scanner (ESAOTE® Pie Medical, Cedex, France) equipped with a 7.5 MHz linear-array transducer. The perineal region and vulvar labia were thoroughly washed and dried.

Absence or presence of uterine discharge was confirmed by vaginoscopy. Embryos were recovered from uterine horns using modified shallow flushing technique described by Sartori *et al.* (2003). Briefly, one catheter was placed in each horn at the same time. Balloons of the catheters were inflated with air and located 5 cm cranial to the uterine bifurcation. Each uterine horn was flushed 14 times using 30 ml of Vigro™ Complete flush (Pullman, WA, USA). A period of 30 minutes was allowed before the recovery of the last infused volume and removal of catheters. The uterine fluid was recovered and filtered using Minitube® filter (MINIFLUSH™ Embryo Recovery system, On., Canada) to harvest embryos.

## **3. Embryo handling and evaluation**

Embryos were identified under a 10 X magnification objective using a stereoscopic dissecting microscope and transferred to a small dish for morphological evaluation (50 to



100 X magnification) according to the criteria of the International Embryo Transfer Society (1998).

#### **4. Blood sampling**

After embryo recovery, individual blood samples were taken by coccygeal venipuncture into 7 ml tubes without anticoagulants (Vacutainer® BD, Franklin Lakes NJ, USA). The samples were left at 4°C for 20 minutes to allow clotting and then centrifuged at 1500 X g for 15 minutes at 4°C; sera were then collected and stored at -80°C until analysis.

#### **5. Uterine secretion sampling**

Uterine secretion sample corresponds to the recovery of the first 30 mL infused volume. At that time, the solution was left undisturbed in the horn for 1 minute before being gently recovered. All recovered fluid was filtered through a Minitube® filter and transferred to a 50 mL screw cap conical base tube (Stated Inc, Newton, NC, USA). The fluid sample was centrifuged at 1500 X g for 15 minutes at 4°C and the sediment was recovered for cytological examination and the fluid was aliquoted and stored at -80°C until analysis.

#### **6. Uterine bacteriology and cytology assessment**

Bacteriological examination was done to assess the presence or absence of pathogens in the uterus. Samples of uterine lavage were sent to the bacteriological laboratory of the Faculté de médecine vétérinaire of the Université de Montréal for routine bacteriological examination. Briefly, each uterine fluid sampling was cultured at 37°C aerobically for 48 h on sheep blood agar and MacConkey agar. Bacteria were identified on the basis of colony, Gram stain, morphology, haemolysis and biochemical profile (Barrow and Feltham, 1993). Bacterial growth density of each bacterial species was scored semi-quantitatively by estimating the number of colonies detected on the gelose as described by Noakes *et al.* (1991). Bacterial growth scores from 1+ to 4+ were considered positive (Williams *et al.*, 2007).

Uterine cytology was made in order to assess the uterine inflammatory status. Each uterine lavage samples were centrifuged and a drop of sediment was streaked on to a clean

slide and air-dried. All slides were fixed and stained using Diff Quik<sup>®</sup> (Hermal Stain Co. Inc., Danbury, CT, USA). Cytological assessment was performed as previously described by Kasimanickam et al. (2005). Initially, the whole slide was assessed and representative areas of 5 to 10 microscopic fields were selected to determine the percentage of polymorphonuclear neutrophils (%PMN). More than 18% PMNs on the differential cytology count was considered as indicator of subclinical endometritis as previously described (Kasimanickam et al., 2004).

## **7. Biochemical analysis**

Uterine and blood biochemical profiles were performed by measuring concentration of glucose (Glu), urea nitrogen (urea), total protein (TP), sodium (Na), chlorides (Cl), potassium (K), lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (Ck), progesterone (P4), estradiol 17  $\beta$  (E2), insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2  $\alpha$  (PGFM) in serum and uterine flush samples.

### **a. Glu, TP, K, Cl, Na, LDH and urea nitrogen assay**

Concentrations of Glu, TP, Na, Cl, K, LDH and urea nitrogen were analyzed on Beckman-Synchron DX auto analyzer (Beckman instruments, Fullerton, CA, USA) using Beckman reagents. Glucose and TP were measured by colorimetric end-points methods. Enzymatic activity of LDH, urea and Ck concentration were measured by kinetic-enzymatic methods. Concentration of Na, K and Cl were measured using ion specific electrodes.

### **b. E2 and P4 assay**

Concentrations of P4 and E2 were measured on IMMULITE<sup>®</sup> 1000 using immulite reagents (IMMULITE<sup>®</sup> 1000 systems, Siemens, Gwynedd, UK). E2 and P4 were quantified by chemiluminescent solid phase enzyme immunoassay (Martin et al., 2007). The coefficient of variation and assay sensitivity for P4 and E2 were 7.90%, 4.69% and 0.2 ng/mL and 15 pg/ mL respectively.

### c. PGFM assay

Concentrations of PGFM were assessed using 13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin F2  $\alpha$  EIA Kit (Cayman chemical company, Mi.) according to the instructions provided by the manufacturer. The PGFM standard curve ranged from 7.81 to 1000 pg/mL. Intra and inter assay coefficient of variations for serum and uterine lavage samples were 13.70%, 9.74%, 13.46% and 8.03% respectively. The detection limits for serum and uterine flush were 8.53 and 9.94 pg/mL respectively.

### d. IGF-1 assay

Concentration of IGF-1 was measured in uterine and serum samples of 20 cows of group II. Immunoreactive IGF-1 was quantified using a commercial double antibody RIA kit (Mediagnost<sup>®</sup>, Reutlingen, Germany). The assay was based on the dissociation of IGF-1 from the IGF binding protein. The recombination of IGF-1 to IGF binding protein was blocked by addition of IGF-1 antiserum containing an excess of IGF-2. Cross-reactivity for IGF-2 was less than 0.05%. According to the instructions provided by the manufacturer, serum samples were diluted in dilution buffer (1:100) while uterine lavage samples were diluted in acidification buffer (10:1). The sensitivity of the assay was 10 ng/mL. The inter assay coefficient of variation at 50% B/B<sub>0</sub> was 7.4%.

## 8. Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using SAS (version 8.2, Cary, NC, USA). Difference between bacteriology and cytology results at D7 and DER were tested using Proc. FREQ (McNemar test). Wilcoxon non-parametric correlation was used to assess the correlation between uterine bacteriology and cytology and number of TE. Spearman non-parametric correlation was used to determine the correlation between uterine and serum biochemical parameters and uterine and serum biochemical parameters and number of TE. The effect of SOV on uterine and serum biochemical parameters was analyzed by ANOVA with a repeated measure using Proc. GLM. The model included the group (group I vs. group II) as between-subject factors and time (D7 vs. DER) as within-subject factors. Mean values of parity, age, DIM, volume of uterine lavage recovered and number of oocytes/embryos were reported with standard deviation ( $\pm$  SD) while mean values of

biochemical parameters were reported with standard error of the mean ( $\pm$  SEM). A probability value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

### III. Results

The average ( $\pm$  SD) age, parity and DIM of cows were  $4.37 \pm 2.32$  years,  $2.12 \pm 1.34$  and  $135.25 \pm 57.42$  days respectively.

There was no significant difference in the volume of uterine lavage recovered at D7 and DER. The amount of uterine lavage recovered ranged from 23.5 to 27 mL. The mean volume of uterine lavage collected was  $25 \pm 1.15$  mL for the two groups. At DER, all cows showed no uterine discharge during visual inspection and vaginoscopy.

#### A. Superovulation response

The estimated number of CL by transrectal palpation and ultrasound scanner showed an average ( $\pm$  SD) of  $12.00 \pm 4.57$  per cow at DER. A mean of  $7.39 \pm 6.22$  oocytes/embryos was collected, of which  $3.32 \pm 4.81$  were TE,  $0.50 \pm 1.00$  were degenerated and  $3.51 \pm 4.30$  were non fertilized oocytes.

#### B. Uterine bacteriology and cytology

There was no significant change of uterine bacteriology and cytology between D7 and DER for both groups. At D7, no positive bacteriology was observed and just one cow was positive (*Enterococcus spp*) at DER in group I. In group II, 10.71 % of the cows (n=3) were bacteriologically positive at D7 and DER. Bacteria isolated were *Arcanobacterium spp* (n=2) and *Achromobacter xyloxi*dans (n=1) at D7 and *Arcanobacterium spp* (n=1), *Pseudomonas spp* (n=2), *Pseudomonas aeroginosa* (n=2) and *Corynebacterium spp* (n=1) at DER. All cows were negative to uterine cytology. The percentage of PMN on the cytological slides ranged from 0.9 to 3.1%.

There was no significant association between uterine bacteriology and cytology and number of TE in group II. Wilcoxon's non-parametric test indicated that negative cytology and positive or negative bacteriology at D7 and DER had no effect on the distribution of the number of TE.

### C. Uterine and serum biochemical parameters

Concentrations of uterine and serum biochemical parameters in group I and group II are presented in Table 2 and Table 3 respectively.

Significant correlations were found between uterine and serum PGFM at DER ( $r = 0.86$ ,  $P < 0.05$ ) in group I and P4 at D7 ( $r = 0.41$ ,  $P < 0.05$ ), PGFM at D7 ( $r = 0.78$ ,  $P < 0.001$ ) and DER ( $r = 0.70$ ,  $P < 0.001$ ) in group II.

There were significantly higher concentrations at DER than D7 for serum urea and E2 and uterine Glu, Ck, LDH, TP, P4 and PGFM in group I (Table 2) and for serum P4 and PGFM and uterine LDH and PGFM in group II (Table 3).

At D7, for uterine biochemical parameters, group II had lower concentration of Glu ( $P < 0.0001$ ), Ck ( $P = 0.004$ ) and E2 ( $P = 0.0003$ ) and a higher concentration of K ( $P < 0.0001$ ) and Cl ( $P < 0.0001$ ) compared to group I whereas in regard to serum biochemical parameters, the two groups were similar except for K (group I > group II,  $P < 0.01$ ). At DER, for the uterine parameters, the group II had lower Glu ( $P < 0.0001$ ), Ck ( $P < 0.0001$ ), urea ( $P < 0.0001$ ), LDH ( $P < 0.0001$ ), TP ( $P = 0.0003$ ), E2 ( $P = 0.0009$ ) and higher K ( $P < 0.0001$ ), Cl ( $P = 0.0002$ ) and PGFM ( $P = 0.002$ ) compared to group I. In regard to serum parameters, group II had higher urea ( $P < 0.0001$ ), LDH ( $P = 0.008$ ), P4 ( $P = 0.0002$ ) and PGFM ( $P = 0.009$ ) compared to group I.

There were significant positive correlations between number of TE and serum IGF-1 at D7 ( $r = 0.45$ ,  $P = 0.001$ ) and P4 at DER ( $r = 0.43$ ,  $P < 0.05$ ) and significant negative correlation between number of TE and serum and uterine PGFM at D7 ( $r = -0.67$ ,  $P < 0.001$  and  $r = -0.54$ ,  $P < 0.005$ ) and DER ( $r = -0.57$ ,  $P < 0.002$  and  $r = -0.48$ ,  $P < 0.01$ ). Also, the number of TE tended ( $P < 0.1$ ) to be negatively correlated with uterine Na at DER and serum K at D7 and positively correlated with serum urea at D7 and Ck at DER.

### IV. Discussion

Successful embryo development during early pregnancy depends upon the nature of uterine luminal environment (Barnes, 2000). In the present study, we proposed that changes in the uterine secretion components may affect the number of TE following SOV.

Based on uterine and serum biochemical parameters' concentrations, the variations occurring within each group between D7 and DER and the comparison of the two groups at

DER suggest that SOV leads to uterine and serum biochemical changes affecting the number of TE.

In serum, there was a significant variation of E2 and urea in group I and P4 and PGFM in group II. In uterus, there were a significant variation of Glu, Ck, LDH, TP, P4 and PGFM in group I and LDH and PGFM in group II. These data support the evidence that SOV leads to more changes in uterus than in serum. In addition, the positive correlation between serum P4 at DER and negative correlation between uterine and serum PGFM at D7 and DER and the number of TE suggest that not only SOV led to changes in both uterus and serum but these changes also impaired the number of TE.

Inactivation of prostaglandins is performed by the reduction at  $\Delta 13$  double bond by a  $\Delta 13$ -15-ketoprostaglandin reductase to the stable metabolite 13,14-dihydro-15-keto prostaglandin referred to as PGFM (Tai et al., 2001). In the present study, SOV had a significant effect on different uterine and serum metabolites, but more specifically on PGFM. The finding that both groups had enhanced uterine and serum PGFM at DER than at D7 was unexpected. Normally, the CL remains functional when cow become pregnant and PGF  $2\alpha$  secretion in early pregnancy is inhibited by P4 (Mann and Lamming, 2001). Also, interferon-tau produced by bovine fetus inhibits luteolysis by preventing oxytocin-stimulated PGF  $2\alpha$  secretion (Mann et al., 2006). It was noticed, in sow and ewe, an increased PGFM level that was maintained in uterine venous and ovarian arterial blood and luteal tissue during early pregnancy (at day 18 of pregnancy) (Stefanczyk et al., 1990; Weems et al., 1995). In ewe, a study of Silvia and Raw (1993), suggested the existence of changes in intracellular regulatory pathways that control synthesis of PGF  $2\alpha$  in response to oxytocin which appears to be mediated by phospholipase C. Therefore, increased PGFM at DER in both groups in the present study might be related to the same pattern occurring in ewe during early pregnancy.

According to the negative correlation between uterine and serum PGFM at D7 and DER and the number of TE, the most significant clinical consequence of enhanced PGFM between D7 and DER is that the higher the concentration of PGFM in the serum and uterus the lower the number of TE was recovered. PGFM increase is caused by several factors such as manipulation of the reproductive tract (Wann and Randel, 1990; Velez et al., 1991), nutrition (Santos et al., 2008), mastitis (Hockett et al., 2000), and uterine inflammation or

infection (Del Vachio et al., 1994; William et al., 2007). Uterine and serum PGFM concentrations in the present study ranged from  $53.91 \pm 9.21$  to  $94.56 \pm 4.60$  pg/mL whereas those of Wann et Randel (1990) and Velez et al. (1991) were up to  $276 \pm 31.6$  pg/mL after 2 min of a gentle uterine manipulation. Uterine samples in the present study were collected immediately before uterine flush for the embryo recovery and therefore before intensive uterine manipulations. This difference in measured PGFM concentrations might result from differences of period of studies (between 29 and 35 DIM vs 80 to 185 DIM in the present study) or cows used (Brahman cows and first calf heifers vs Holstein cows in the present study).

In the present study, all cows received the same diet during the experiment and no evidence of mastitis was observed. In addition, reproductive tracts (cervix, uterus and ovaries) of cows were normal on transrectal palpation, vaginoscopy and on ultrasonographic examination. No evidence of clinical endometritis according to the criteria of Leblanc et al. (2002) was observed and positive or negative uterine bacteriology and cytology did not show any significant effect on the number of TE. Hence, elevated PGFM at DER in group II is probably, not attributed to nutrition, uterine infection or inflammation and uterine manipulation. The possible explanation of group II's PGFM increase at DER is, perhaps, the presence of elevated P4 at DER due to the presence of multiple CL. Indeed, elevated P4 enhances its uterine receptor desensitization (Okumu et al., 2010) that result in the activation of PGF  $2\alpha$  release and therefore, causing the increase of PGFM (dos Santos et al., 2009).

The negative correlation found between PGFM and number of TE in the present study is consistent with previous studies (Seals et al., 1998; Scenna et al., 2004; Weems et al., 2006 and Neglia et al., 2008). The PGF  $2\alpha$  can have a direct effect on embryo survival and development however; the specific mechanism of action remains unclear. Scenna et al. (2004) have investigated the actions of PGF  $2\alpha$  on embryonic development by culturing *in vitro* 16-32 cell embryos and morula stage embryos into milieu containing various concentrations of PGF  $2\alpha$ . The results showed a direct negative effect of PGF  $2\alpha$  on pre-compacted and compacted embryos throughout reduced blastocyst development and decreased hatching suggesting the existence of low cell-cell interactions that lead to

impaired embryo cellular differentiation and growth, resulting in embryonic death (Scenna *et al.*, 2004).

In this study, there was no correlation between serum and uterine IGF-1 at D7 and DER, which contrasts with previous reports (Herrler *et al.* 1994, and Cushman *et al.* (2001). Although it has been reported that there is IGF-1 production in follicles (Yuan *et al.*, 1998; Schams *et al.*, 2002), studies undertaken by Sudo *et al.* (2007) and Spicer and Aad (2007) clearly demonstrated the importance of IGF-1 derived from peripheral circulation in any stages of follicular development (Velazquez *et al.*, 2008a). This supports the positive correlation between the number of TE and serum IGF-1 at D7 in the present study. The hormone IGF-1 plays an important role in the transitional phase, from 2 to 5 mm diameter follicles (Monget et Bondy, 2000). Also, IGF-1 is a potent stimulator of oocyte maturation, and subsequent embryo development (Stefanello *et al.*, 2006; Velazquez *et al.*, 2008b). Several *in vitro* studies clearly demonstrated that the addition of IGF-1 to culture medium reduced the proportion of apoptotic blastomeres in both oocyte and embryo (Byrne *et al.*, 2002; Block *et al.*, 2007). Moreover, oocyte quality plays an important role in embryonic development capacity (Greve *et al.*, 1995). These data support a direct effect of IGF-1 on oocyte maturation and eventually on the positive correlation between serum IGF-1 and the number of TE.

The precise relationship between maternal hormone environment and embryo development has not been well established. Some studies (Garrett *et al.*, 1988 ; Mann *et al.* 2006) demonstrated improved pregnancy rates and increased embryo development after exogenous P4 administration. Those of Mann and Lamming (1999) and Mann *et al.* (2003) demonstrated a relationship between low maternal P4 concentration and pregnancy failure. A positive association between milk or plasma P4 and embryo survival on either day 4 or day 5 or 6 of estrus cycle was found (Green *et al.*, 2005; McNeill *et al.*, 2006, Green *et al.*, 2005). The P4 production by granulosa cells cocultured with bovine embryos showed a two-phase increase (4-5 days and 11-14 days of cell culture) associated with embryo cleavage and the transition from expanded to hatch blastocysts respectively (Vasques *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 2006). These results are in contrast to those of Carter *et al.* (2008) who showed no effect of elevated P4 on the proportion of embryos at the expected stage of development on day 5 (16 cell to morula stage) or day 7 (blastocyst stage). Even with the



actual debate on the effect of P4 on early embryo development, it is known that P4 is the key hormone in the establishment and maintenance of pregnancy (Thatcher *et al.*, 2002). In the present study, there was a higher serum P4 in group II at DER compared to group I. This increase of serum P4 was positively correlated to the number of TE resulting from presence of multiple CL (Lonergan *et al.*, 2007).

Increased serum urea impaired fertility in dairy cattle and therefore embryo growth and survival (Butler *et al.*, 1998; Rhoads *et al.*, 2006). In the present study, at DER, significantly higher serum urea in group II compared to group I did not impair the number of TE because the measured concentrations were in the normal range (Butler *et al.*, 1998; Rhoads *et al.*, 2006). On the other hand, serum urea is related to proteins in the diet but embryo development is not necessarily affected by high protein concentration of the diet. Long-term quickly degradable nitrogen treatment had no effect on either the number or the quality of recovered embryos (Dawuda *et al.*, 2002, Laven *et al.*, 2004). Also, there is no significant association between TP and the number of TE (Chorfi *et al.*, 2007).

At DER, group II had high serum LDH and low uterine Glu and LDH compared to group I. Also, these parameters were not correlated with the number of TE. There are contradictory reports about Glu; numerous studies reported an absence of Glu effect on embryo development (Matsuyama *et al.*, 1993; Hugentobler *et al.*, 2008). However, increased circulating Glu was associated with increased cleavage rate to the blastocyst stage (Donnay *et al.*, 2002; Sutton-McDowall *et al.*, 2010) and was involved in early embryo energy metabolism (Sutton-McDowall *et al.*, 2010). In an *in vitro* experiment, LDH was reported as indicator of embryo viability and may play an important role during energy metabolism in early embryo development (Basset, 1991, Johnson *et al.*, 1991). Therefore, low uterine LDH associated with low uterine Glu and high serum P4 at DER in the present study might result from the presence of several developing embryos within the uterus.

Bacteriology and cytological examinations were done to determine uterine infection or inflammation. The PMN threshold to define subclinical endometritis varies at different time postpartum (Kasimanickam *et al.*, 2004). Use of criteria defined by Kasimanickam *et al.* (2004) supporting the presence of  $\text{PMN} \geq 18\%$  on cytology count as indicator of subclinical endometritis; showed no positive cytology. The present study was performed at average DIM of  $135.25 \pm 57.42$ , whereas that of Kasimanickam *et al.* (2004) was done at

20 to 30 DIM. Also, there was no association between cytology and the number of TE suggesting that endometrial cytology with PMN threshold at 0.9 to 3.1% did not impair the embryo production during SOV between 80 to 185 DIM. Furthermore, the fact that 3 cows had *Arcanobacterium pyogenes* either at D7 and DER did produced no TE suggests that the presence of recognized pathogens bacteria within the uterus (William et *al.*, 2005) may impair embryo production following SOV.

In conclusion, results of the present study provide evidence that SOV leads to changes in uterine and serum biochemical parameters affecting the number of TE in Holstein dairy cows. Also, the number of TE was positively correlated with serum IGF-1 at D7 and with P4 at DER and negatively correlated with serum and uterine PGFM at D7 and DER. Therefore, it can be speculated that SOV response might be predicted at D7 from 80 to 185 DIM by means of serum IGF-1 and serum or uterine PGFM.

## **V. Acknowledgements**

The authors would like to thank Guy Beauchamp for his help with statistical analyses.

## **VI. References**

- Albihn, A., Gustafson, H., Rodriguez-Martinez, H. 1991. Maternal influence on the early development of asynchronously transferred bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 24 : 25-35.
- Banu, S.K., Arosh, J.A., Chapdelaine, P., Fortier, M.A. 2003. Expression and regulation of prostaglandin transporter in corpus luteum and utero-ovarian plexus during the oestrous cycle and pregnancy. *Biol. Reprod.* 68 : 175 (Abstract).
- Barnes, F.L. 2000. The effects of the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. *Theriogenology* 53 : 649–658.
- Bassett, J.M. 1991. Symposium on recent research in the placenta. *Proceedings of the Nutrition Society* 50 : 311–319.

Bavister, B.D. 2000. Interactions between embryos and the culture milieu. *Theriogenology* 53 : 619–626.

Benyei, B., Gaspard, A., Komlosi, I., Pecsi, A. 2004. Repeatability and Heritability of Ovulation Number and Embryos in Dam-daughters Pairs in Superovulated Holstein–Friesian Cows. *Reprod. Dom. Anim.* 39 : 99–102 Blackwell Verlag, Berlin.

Block, J., Wrenzyck, C., Herrmann, D., Rodina, T.M., Niemann, H., Ealy, A.D., et al. 2007. Effect of insulin-like growth factor-1 during culture on blastocyst mRNA abundance and survival in utero to day 14 of bovine embryos produced in vitro. *J. Anim. Sci.* 68 : 153–161.

Boland, M.P., Lonergan, P., O’Callaghan, D. 2001. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology* 55 : 1323–1340.

Butler, W.R., 1998. Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 81 : 2533–2539.

Byrne, A.T., Southgate, J., Brison, D.R., Leese, H.J. 2002. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin like growth factor (IGF) superfamily. *Mol. Reprod. Dev.* 62 : 489–95.

Carter, F., Forde, N., Duffy, P., Wade, M., Fair, T., Crowe, M.A., et al. 2008. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reprod. Fertil. Dev.* 20 : 368–375.

Chagas e Silva, J., Lopes da Costa, L., Robalo Silva, J. 2002. Embryo yield and plasma progesterone profiles in superovulated dairy cows and heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 69 : 1–8.

Chebel, R.C., Demétrio, D.G.B., Metzger, J. 2008. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology* 69 : 98-106.

Chorfi, Y., Lanevaschi, A., Dupras, R., Girard, V., Tremblay, A. 2007. Serum biochemical parameters and embryo production during superovulatory treatment in dairy cattle. *Research in Vet. Sci.* 83 : 318-321.

Clark, J. F., Kuznetsov, A. V., Khuchua, Z., Veksler, V., VenturaClapier, R., Saks, V. 1994. Creatine kinase function in mitochondria isolated from gravid and non-gravid guinea-pig uteri. *FEBS Lett.* 347 : 147–151.

Cushman, R.A., DeSouza, J.C., Hedgpeth, V.S., Britt, J.H. 2001. Effect of long-term treatment with recombinant bovine somatotropin and estradiol on hormone concentrations and ovulatory response of superovulated cattle. *Theriogenology* 55 : 1533–1547.

Cushman, R.A., DeSouza, J.C., Hedgpeth, V.S., Britt, J.H. 1999. Superovulatory response of one ovary is related to the micro- and macro-scopic population of follicles in the contralateral ovary of the cow. *Biol. Reprod.* 60 : 349–354.

Dawudaa, P.M, Scaramuzia, R.J., Leese, H.J., Hall, C.J., Peters, A.R., Drew, S.B . et al. 2002. Effect of timing of urea feeding on the yield and quality of embryos in lactating dairy cows. *Theriogenology* 58 (8) : 1443-1455.

De Roover, R., Bols, P.E.J., Genicot, G., Hanzen, C.H. 2005. Characterisation of low, medium and high responders following FSH stimulation prior to ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval in cows. *Theriogenology* 63 : 1902-1913.

Del Vecchio, R.P., Matsas, D.J., Fortin, S., Sponenberg, D.P., Lewis, G.S. 1994. Spontaneous uterine infections are associated with elevated prostaglandin f2  $\alpha$  metabolite concentrations in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 41 : 413-421.

Donnay, I., Feugang, J.M., Bernard, S., Marchandise, J., Pampfer, S., Moens, A. et al. 2002. Impact of adding 5.5 mM glucose to SOF medium on the development, metabolism and quality of in vitro produced bovine embryos from the morula to the blastocyst stage. *Zygote* 10 : 189-199.

Dos Santos, R.M., Goissis, M.D., Fantini, D.A., Bertan, C.M., Vasconcelos, J.L.M., Binelli, M. 2009. Elevated progesterone concentrations enhance prostaglandin F2  $\alpha$  synthesis in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 114 : 62–71.

Edmonson, A.J., Lean, I.J., Weaver, L.D., Farver, T., Webster, G. 1989. A body condition scoring chart for holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72 (1) : 68-78.

Garrett, J.E., Geisert, R.D., Zavy, M.T., Morgan, G.L. 1988. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *J. Reprod. Fertil.* 84 : 437–446.

Green, M.P., Hunter, M.G., Mann, G.E. 2005. Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 88 : 179-189.

Greve, T., Callesen, H., Hyttel, P., Høier, R., Assey, R. 1995. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 43 : 41–50.

Herrler, A., Einspanier, R., Schams, D., Niemann, H. 1994. Effect of recombinant bovine somatotropin (rBST) on follicular IGF-1 contents and the ovarian response following superovulatory treatment in dairy cows : a preliminary study. *Theriogenology* 41 : 601–611.

Hockett, M.E., Hopkins, F.M., Lewis, M.J., Saxton, A.M., Dowlen, H.H, Olivier, S.P. et al. 2000. Endocrine profiles of dairy cows following experimentally induced clinical mastitis during early lactation. *Anim. Reprod. Sci.* 58 : 241–251.

Hugentobler, S.A., Humpherson, P.G., Leese, H.J., Sreenan, J.M., Morris, D.G. 2008. Energy substrates in bovine oviduct and uterine fluid and blood plasma during the estrous cycle. *Mol. Reprod. Dev.* 75 : 496-503.

Johnson, A.E., Lane, M., Gardner, D.K., Diekman, M.A., Krisher, R.L. 2001. Changes in follicular fluid environment between 5 mm and 10 mm follicles. In Annual Conference of Society for the Study of Reproduction 128.

Kaneko, H., Terada, T., Watanabe, G., Sasamoto, S., Hasegawa, Y., Igarashi, M. 1991. Ovulatory follicle dynamics and the concentration of oestradiol 17 $\beta$ , progesterone, luteinising hormone and follicle stimulating hormone during the periovulatory phase of the oestrous cycle in the cow. *Reprod. Fertil. Dev.* 3 : 529–535.

Kasimanickam, R., Duffield, T.F., Foster, R.A., Gartley, C.J., Leslie, K.E., Walton, J.S. et al. 2004. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 62 : 9-23.

Kasimanickam, R., Duffield, T.F., Foster, R.A., Gartley, C.J., Leslie, K.E., Walton, J.S., et al. 2005. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Can. Vet. J.* 46 : 255-259.

Killian, G.J. 2004 Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Anim. Reprod. Sci* 82–83 : 141–153.

Kim, I.H., Son, D.S., Yeon, S.H., Choi, S.W., Park, S.B., Ryu, I.S. et al. 2001. Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. *Theriogenology* 55 : 937–45.

Kuehner, L.F., Rieger, D., Walton, J.S., Zhao, X., Johnson, W.H. 1993. The effect of a depot injection of recombinant bovine somatotropin on follicular development and embryo yield in superovulated Holstein heifers. *Theriogenology* 40 : 1003–1013.

Laven, R. A., Dawuda, P. M., Scaramuzzi, R. J., Wathes, D. C., Biggadike, H. J., Peters, A. R. 2004. The effect of feeding diets high in quickly degradable nitrogen on follicular development and embryo growth in lactating Holstein dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 84 : 41-52

Leblanc, S.J, Duffield, T.F., Leslie, K. E., Bateman, K. G., Keefe, G. P., Walton, J. S. et al. 2002. Defining and diagnosing post partum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85 (9) : 2223-2236.

Lonergan, P., Woods, A., Fair, T., Carter, F., Rizos, D., Ward, F. et al. 2007. Effect of embryo source and recipient progesterone environment on embryo development in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 19 : 861-868.

Lopez, H., Satter, L.D., Wiltbank, M.C. 2004. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 81 : 209–223.

Malayer, J.R., Hansen, P.J., Gross, T.S., Thatcher, W.W. 1990. Regulation of heat shock-induced alterations in the release of prostaglandins by the uterine endometrium of cows. *Theriogenology* 34 : 219–230.

Man, G.E., Lamming, G.E. 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *J. Reprod. Fertil.* 121 : 175-180.

Mann, G.E., Fray, M.D., Lamming, G.E. 2006. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the cow. *Vet. J.* 171 : 500-503.

Mann, G.E., Green, M.P., Sinclair, K.D., Demmers, K.J., Fray, M.D., Gutierrez, C.G. et al. 2003. Effects of circulating progesterone and insulin on early embryo development in beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 79 : 71-79.

Mann, G.E., Lamming, G.E. 1999. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod. Dom. Anim.* 34 : 269–274.

Mapletoft, R.J., Bennett Steward, K., Adams, G.P. 2002. Recent advances in the superovulation of cattle. *Reprod. Nutr. Dev.* 42 : 601–11.

Martin, J. L., Vonnahme, K. A., Adams, D. C., Lardy, G. P. et Funston, R. N. 2007. Effects of dam nutrition on growth and reproductive performance of heifer calves. *J. Anim. Sci.* 85 : 841-847.

Mateus, L., da Costa, L.L., Bernardo, F., Silva, J.R. 2002. Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 37 : 31–35.

Matsuyama, K., Miyakoshi, H., Y. Fukui. 1993. Effect of glucose levels during the in vitro culture in synthetic oviduct fluid medium on in vitro development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* 40; 3 : 595-605.

McNeill, R.E., Diskin, M.G., Sreenan, J.M., Morris, D.G. 2006. Association between milk progesterone concentration on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows. *Theriogenology* 65 : 1435-1441.

Monget, P., Bondy, C. 2000. Importance of the IGF system in early folliculogenesis. *Mol. Cel. Endoc.* 163 : 89–93.



- Neglia, G., Natale, A., Esposito, G., Salzillo, F., Adinolfi, L., Campanile, G. et al. 2008. Effect of prostaglandin F2a at the time of AI on progesterone levels and pregnancy rate in synchronized Italian Mediterranean buffaloes. *Theriogenology* 69 : 953-960.
- Noakes, D.E., Wallace, L., Smith, G.R. 1991. Bacterial flora of the uterus of cows after calving on two hygienically contrasting farms. *Vet. Rec.* 128 : 440–442.
- O’Callaghan, D., Yaakub, H., Hyttel, P., Spicer, L.J., Boland, M.P. 2000. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J. Reprod. Fertil.* 118 : 303–313.
- Okumu, L. A., Forde, N., Fahey, A.G., Fitzpatrick, E., Roche, J. F., Crowe, M. A. et al. 2010. The effect of elevated progesterone and pregnancy status on mRNA expression and localisation of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus. *J. Reprod. Fertil.* 140 : 043-153.
- Pereira, R.M., Vasques, M.I., Cunha, T.P., Marques, C.C., Baptista, M.C., Horta, A.E.M. 2006. Bovine embryos and prostaglandins (PG) induce progesterone (P4) secretion by granulosa cells in vitro. *Reprod. Dom. Anim.* 41 : 335.
- Randel, R.D., Lammoglia, M.A., Lewis, A.W., Neuendorff, D.A., Guthrie, M.J. 1996. Exogenous PGF2a enhanced GnRH-induced LH release in postpartum cows. *Theriogenology* 45, 643–654.
- Rhoads, M.L., Rhoads, R.P., Gilbert, R.O., Toole, R., Butler, W.R. 2006. Detrimental effects of high plasma urea nitrogen levels on viability of embryos from lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 91 : 1 -10.
- Santos, J.E.P., Cerri, R.L.A., Sartori, R. 2008. Nutritional management of the donor cow. 2008. *Theriogenology* 69 (1) : 88-97.

Sartori, R., Haughian, J.M., Shaver, R.D., Rosa, G.J.M., Wiltbank, M.C. 2004. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J. Dairy Sci.* 87 : 905–920.

Sartori, R., Suarez-Fernandez, C.A., Monson, R.L., Guenther, J.N., Rosa, G.J.M., Wiltbank, M.C. 2003. Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. *Theriogenology* 60 : 1319-1330.

Sattler, T., Furl, M. 2004. Creatine kinase and aspartate aminotransferase in cows as indicators for endometritis. *J. Vet. Med. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine* 51, 132–137.

Scenna, F.N., Edwards, J.L., Rohrbach, N.R., Hockett, M.E., Saxton, A.M., Schrick, F.N. 2004. Detrimental effects of prostaglandin F<sub>2</sub>  $\alpha$  on preimplantation bovine embryos. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 73 : 215–226.

Schams, D., Berisha, B., Kosmann, M., Amselgruber, W.M. 2002. Expression and localization of IGF family members in bovine antral follicles during final growth and in luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy. *Domest. Anim. Endocrinol.* 22, 51–72.

Seals, R.C., Lemaster, J.W., Hopkins, F.M., Schrick, F.N. 1998. Effects of Elevated Concentrations of Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  on Pregnancy Rates in Progestogen Supplemented Cattle. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 56 : 377–389.

Seals, R.C., Wulster-Radcliffe, M.C., Lewis, G.S. 2003. Uterine response to infectious bacteria in estrous cyclic ewes. *Am. J. Reprod. Immunol.* 49: 269–278.

Sheldon, I.M., Noakes, D.E., Rycroft, A.N., Pfeiffer, D.U., Dobson, H. 2002. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 123 : 837–845.

Silvia, W.J., Raw, R.E. 1993. Activity of phospholipase C and release of prostaglandin F<sub>2α</sub> by endometrial tissue from ewes during the oestrous cycle and early pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* 97: 529-537.

Singh, J., Dominguez, M., Jaiswal, R., Adams, G. A. 2004. Simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology* 62:227–43.

Sirard, M.A., Richard, F., Blondin, P., Robert, C. 2006 Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 65:126–136.

Spencer, T.E., Bazer, F.W. 1995. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol. Reprod.* 53 : 1527–1543.

Spicer, L.J., Aad, P.Y. 2007. Insulin-like growth factor (IGF) 2 stimulates steroidogenesis and mitosis of bovine granulosa cells through the IGF-1 receptor: role of follicle-stimulating hormone and IGF2 receptor. *Biol. Reprod.* 77 : 18–27.

Stefanczyk, S., Krzymowski, T., Einer-Jensen, N., Kaminski, T., Kotwica, J., 1990. Local transfer of prostaglandin F<sub>2a</sub> from the uterine lumen into the venous and arterial blood and into the uterine, mesometrial and ovarian tissue on day 18 of pregnancy in the pig. *Anim. Reprod. Sci.* 23 : 223–235.

Stefanello J.R., Barreta, M.H., Porciuncula, P.M., Arruda, J.N., Oliveira, J.F., Oliveira, M.A. et al. 2006. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. *Theriogenology* 66 : 2068–2076.

Stringfellow DA, Seidel SM. Manual of the International Embryo Transfer Society. Savoy (IL) : International Embryo Transfer Society; 1998.

Sudo, N., Shimizu, T., Kawashima, C., Kaneko, E., Tetsuka, M., Miyamoto, A. 2007. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) system during follicle development in the bovine ovary: Relationship among IGF-1, type 1 IGF receptor (IGFR-1) and pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A). *Mol. Cel. Endoc.* 264 : 197-203.

Sutton-McDowall, M.L., Gilchrist, R.B., Thompson, J.G. 2010. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *J. Reprod. Fertil.* 139 : 685-695.

Tai, C.J., Kang, S.K., Choi, K.C., Tzeng, C.R., Leung, P.C.K. 2001. Role of mitogenactivated protein kinase in prostaglandin F2a action in human granulosaluteal cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86 375–380.

Thatcher, W.W., Guzeloglu, A., Mattos, R., Binelli, M., Hansen, T.R., Pru, J.K. 2002. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology*, 57 : 1436-1449.

Vasques, M.I., Marques, C.C., Pereira, R.M., Baptista, M.C., Horta, A.E.M. 1998. Luteotrophic effect of bovine embryos and different sera supplementation on granulose cell monolayers in vitro. *Rev. Port. Cienc. Vet.* 23 : 25-30.

Velazquez, M .A., Zaraza, J., Oropeza, A., Webb, R., Niemann, H. 2009. The role of IGF1 in the in vivo production of bovine embryos from superovulated donors. *J. Reprod. Fertil.* 137 : 167-180.

Velazquez, M. A., Spicer, L. J., Wathes, D. C. 2008a. The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-1) in female bovine reproduction. *Dom. Anim. Endoc* 35 : 325-3482.

Velazquez, M.A., Korsawe, K., Niemann, H. 2008b. The effects of physiological and non-physiological insulin-like growth factor-1 (IGF-1) concentrations on the in vitro development of bovine embryos. *Reprod. Dom. Anim.* 43 202 (abstract 530).

Velez, J.S., Randel, R.D., Neuendorff, D.A. 1991. Effect of uterine manipulation on postpartum fertility and plasma 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2<sub>α</sub> in Brahman cows and first-calf heifers. *Theriogenology* 36 : 987–997.

Wann, R.A., Randel, R.D. 1990. Effect of uterine manipulation 35 days after parturition on plasma concentrations of 13, 14-dihydro-15-keto prostaglandin F2<sub>α</sub> in multiparous and primiparous brahman cows. *J. Anim. Sci.* 68 : 1389–1394.

Weems, C.W., Weems, Y.S., Vincent, D.L., 1995. Maternal recognition of pregnancy and maintenance of gestation in sheep. In: Enne, G.F., Greppi, G.F., Lauria, A. (Eds.), *Proceedings XXX International Simposia Societa Italiana Zootechnica*, Milan, Italy. Elsevier, Amsterdam, Holland, pp. 277–293.

Weems, C.W., Weems, Y.S., Randel, R.D. 2006. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *The Veterinary journal* 171 : 206-228.

Williams, E. J., Fischer, D. P., Pfeiffer, D.U., England, G.C.W., Noakes, D.E., Dobson, H. et al. 2005. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology* 63 (1): 102-117.

Williams, E.J., Fischer, D.P., Noakes, D.E., England, G.C.W., Rycroft, A., Dobson, H. et al. 2007. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology* 68 : 549-559.

Yuan, W., Bao, B., Garverick, H.A., Youngquist, R.S., Lucy, M.C. 1998. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. *Domest. Anim. Endocrinol.* 15 : 55–63.

Zarco, L., Stabenfeldt, G.H., Basu, S., Bradford, G.E., Kindahl, H. 1988b. Modification of prostaglandin F<sub>2a</sub> synthesis and release in the ewe during the initial establishment of pregnancy. J. Reprod. Fertil. 83 : 527–536.

**Table 1** : Composition of total mixed ration

<b>Ingredients</b>	<b>%</b>
Hay silage	20.6
Corn silage	10.8
Dry hay	2.3
Gluten	2.2
Wet corn	8.2
Protein supplement	1.5
Soybean meal	0.7
Mineral supplement	0.4

**Table 2** : Comparison of biochemical parameter concentrations (mean  $\pm$  SEM) measured in serum and uterine lavage in group I at D7 and DER

<b>Parameters</b>	<b>D7</b>		<b>DER</b>		<b>P (D7 vs DER)</b>	
	<b>Serum</b>	<b>Uterine lavage</b>	<b>Serum</b>	<b>Uterine lavage</b>	<b>Serum</b>	<b>Uterine lavage</b>
<b>Glu</b> (mmol/L)	3.77 $\pm$ 0.33	3 $\pm$ 0.02	3.97 $\pm$ 0.33	3.1 $\pm$ 0.02	0.54	<0.01
<b>urea</b> (mmol/L)	5.33 $\pm$ 0.36	0.56 $\pm$ 0.07	3.31 $\pm$ 0.36	0.72 $\pm$ 0.07	<0.01	0.03 <sup>†</sup>
<b>Ck</b> (IU/L)	100 $\pm$ 56.49	334.14 $\pm$ 55.42	234.14 $\pm$ 56.49	601.86 $\pm$ 55.42	0.09	<0.01
<b>LDH</b> (IU/L)	788 $\pm$ 89.17	42.71 $\pm$ 20.51	710.29 $\pm$ 89.17	204 $\pm$ 20.51	0.46	<0.01
<b>TP</b> (g/L)	67.58 $\pm$ 2.36	0.14 $\pm$ 0.03	68.3 $\pm$ 2.36	0.28 $\pm$ 0.03	0.82	<0.01
<b>Na</b> (mmol/L)	139.33 $\pm$ 2.54	143.87 $\pm$ 6.21	139.14 $\pm$ 2.54	143.89 $\pm$ 6.21	0.96	0.99
<b>K</b> (mmol/L)	4.87 $\pm$ 0.17	5.61 $\pm$ 0.12	4.37 $\pm$ 0.17	5.61 $\pm$ 0.12	0.03 <sup>†</sup>	1.00
<b>Cl</b> (mmol/L)	98.5 $\pm$ 1.63	138.46 $\pm$ 1.78	99.92 $\pm$ 1.63	139.93 $\pm$ 1.78	0.54	0.57
<b>E2</b> (pg/mL)	51.90 $\pm$ 12.73	205.14 $\pm$ 8.52	101.66 $\pm$ 12.73	200.43 $\pm$ 8.52	<0.01	0.66
<b>P4</b> (ng/mL)	2.11 $\pm$ 2	0.24 $\pm$ 0.08	2.65 $\pm$ 2	0.55 $\pm$ 0.08	0.85	<0.01
<b>PGFM</b> (pg/mL)	53.91 $\pm$ 9.21	54.9 $\pm$ 6.01	66.12 $\pm$ 9.21	66.65 $\pm$ 6.01	0.17	<0.01

<sup>†</sup> : not significant after Bonferroni correction





## DISCUSSION GÉNÉRALE

Deux grands groupes de facteurs (intrinsèques et extrinsèques) ont été rapportés comme étant sources de variations de la réponse de la SOV. Parmi les facteurs rapportés, il y a : la race, l'anamnèse reproductive, la santé générale de l'animal, le nombre de petits follicules présents au début de vague folliculaire au début de la SOV (Cushman et *al.*, 1999), la qualité de la semence, l'habileté du médecin vétérinaire, le nombre de SOV consécutives (Lucy et *al.*, 1999), la méthode de SOV, la composition des gonadotrophines (Lucy, 2000) ainsi que l'influence de la nutrition au moment de la conception (Dunne et *al.*, 2000). Il semblerait que ces facteurs conditionnent la fertilité des vaches et pourrait constituer un obstacle à la réussite de la SOV.

Peu ou pas d'études ont rapporté la possibilité d'une association entre le milieu utérin et la réponse de la SOV (nombre de CJ sur les ovaires et le nombre d'ET récoltés). Pourtant, d'après Hugentobler et *al.* (2008), l'étude de la normalité des sécrétions du milieu utérin constitue un précieux outil dans l'analyse des problèmes de fertilité des vaches laitières. En effet, il a été clairement démontré que le milieu utérin joue un rôle important durant la fécondation chez les vaches à simple ovulation. De plus, il a été rapporté que la présence d'un milieu utérin adéquat durant les premiers jours de vie de l'embryon dans l'utérus constitue une condition essentielle à sa survie et son développement (Albihn et *al.*, 1991) du fait que durant cette période la survie et le développement de l'embryon dépend des nutriments fournis par les sécrétions du milieu utérin (Ellington, 1991). En considérant que l'environnement utérin joue un rôle important durant les premiers jours de vie de l'embryon chez les vaches à simple ovulation, cette importance devrait être aussi valable chez les vaches surovlées pour que les embryons produits après la SOV puissent survivre et se développer.

Parce que l'embryon doit accéder à l'utérus pour survivre et se développer, il peut être déduit que le milieu utérin est, en quelques sortes, le dénominateur commun du développement et de la survie embryonnaire chez une vache à simple ovulation et surovlée. En outre, une simple comparaison entre le fait d'avoir un simple œstrus et un œstrus lors de la SOV montre que : induire un simple œstrus chez une vache peut se faire par une ou deux injection de PGF 2 $\alpha$  alors que surovuler une vache requiert une

supplémentation en P4, E2, des injections de FSH et de PGF 2 $\alpha$ . De plus, une vache à simple ovulation donne, en général, un seul embryon tandis que une vache surovlée produit environ 4 à 5 embryons.

L'importance du milieu utérin telle que démontré chez la vache à simple ovulation et l'évidence des deux fait sus-énoncés et amènent à spéculer l'existence d'une différence entre le milieu utérin d'une vache à simple ovulation et celle d'une vache surovlée.

Sur la base de l'hypothèse que la SOV pourrait induire des changements du milieu utérin et selon le fait que les paramètres biochimiques retrouvés dans les sécrétions utérines peuvent provenir de la circulation sanguine, la présente étude a été faite en essayant de déterminer l'existence d'une différence entre les paramètres biochimiques du sérum et de l'utérus de vaches à simple ovulation et vaches surovlées. Comme objectif, cette étude se proposait de déterminer l'effet de la SOV sur les paramètres biochimiques sérique et utérin et éventuellement sur le nombre d'ET.

L'hypothèse de la présente étude a été confirmée. En comparant les concentrations des paramètres biochimiques des deux groupes (J7 groupe I vs J7 groupe II; JR groupe I vs JR groupe II) et en déterminant les variations de ces mêmes paramètres dans chaque groupe entre J7 et JR, les résultats démontrent que la SOV induit des changements à la fois au niveau utérin et sérique. Il y avait une différence entre le nombre de paramètres qui varient significativement entre J7 et JR dans les deux groupes. Au niveau sérique, il y avait une variation significative de 2 paramètres pour chaque groupe (E2 et urée dans le groupe I, P4 et PGFM dans le groupe II). Au niveau utérin, le nombre de paramètre qui varient significativement dans le groupe I est le triple de celui groupe II (LDH et PGFM dans le groupe II vs Glu, Ck, LDH, TP, P4 et PGFM dans le groupe I) démontrant que la SOV induit surtout des changements au niveau utérin que sérique. De l'autre côté, la comparaison des concentrations des paramètres biochimiques ressort 3 paramètres communs pour les 2 groupes. Il s'agit de l'urée, LDH et de PGFM. Pour ces paramètres, en termes de concentration, les deux groupes étaient significativement égaux à la fois au niveau utérin et sérique à J7. À JR; au niveau sérique, la concentration de ces paramètres au niveau du groupe I était inférieure au groupe II alors qu'au niveau utérin, le groupe I avait

une concentration élevée d'urée et de LDH et une concentration basse de PGFM lorsque comparé au groupe II suggérant qu'il y a une différence entre les profils biochimiques utérins et sériques des vaches à ovulation unique et vaches suroovulées.

En outre, en plus de varier significativement entre J7 et JR, la concentration sérique de PGFM et de P4 ainsi que la concentration utérine de PGFM à JR ont été associées au nombre d'ET. Les résultats montraient que les vaches possédant une concentration sérique élevée de P4 à JR tendent à produire plus d'ET comparativement aux vaches possédant une concentration sérique et utérine élevée de PGFM à JR qui tendent à produire moins d'ET et suggère que les changements utérin et sérique induites par la SOV affectent également le nombre d'ET.

Parce que les vaches du groupe I (simple chaleur + IA résultant en une production d'un seul embryon) avaient le Glu, Ck, LDH, TP, P4 et PGFM aussi bien que les vaches du groupe II (SOV + IA résultant en une production environ de 4 à 5 embryons) avaient le PGFM et la LDH utérin qui variaient significativement entre J7 et JR et le fait que ces paramètres ont été rapportés comme étant directement ou indirectement impliqués dans le développement embryonnaire, il peut être déduit que la différence entre le profil biochimique utérin de vaches à ovulation unique et vaches suroovulées pourrait résulter de la différence du nombre d'embryon présent dans l'utérus. Autrement dit, la production de plusieurs embryons dans l'utérus des vaches suroovulées implique des changements au niveau de la composition des sécrétions utérines pour assurer leur développement et leur survie. La variation de la concentration des paramètres biochimiques au niveau utérin des vaches suroovulées par rapport à celle du groupe I pourrait résulter de la différence de métabolisme embryonnaire en termes de nombre d'embryons présent dans l'utérus (métabolisme d'un seul embryon vs métabolisme de 4 à 5 embryons).

Le nombre d'ET a été positivement corrélé avec la concentration sérique d'IGF-à JR et de P4 à JR et négativement corrélé avec la concentration sérique et utérine à J7 et JR de PGFM.

La présente étude rapporte pour la première fois la corrélation négative entre le nombre d'ET et la concentration de PGFM (à J7 et JR) *in vivo*. Il était surprenant de trouver que la concentration utérine et sérique de PGFM du groupe II était significativement élevée à JR ( $94.56 \pm 4.6$  dans le sérum et  $90 \pm 3$  pg/mL dans l'utérus) qu'à J7 ( $74.57 \pm 4.6$  dans le sérum et  $69.56 \pm 3$  pg/mL dans l'utérus). La relâche post-fertilisation de la P4 a été rapportée comme étant indispensable à la croissance de l'embryon. Connaissant le rôle de la P4 dans l'établissement et le maintien de la gestation, il s'ensuit que la présence d'une concentration élevée de P4 suite à la présence de plusieurs CJ et embryons aurait dû inhiber la sécrétion de PGF  $2\alpha$  pour empêcher la lyse des CJ et donc assurer le développement des embryons. Comme l'initiation de la SOV consiste à supplémenter la vache en P4 et E2 pour induire l'émergence d'une nouvelle vague, les résultats de dos Santos et *al.* (2009) sur des vaches supplémentées en P4 possédant une concentration élevée de PGFM laisse croire que le maintien d'une concentration élevée de PGFM à JR dans la présente étude est à peu près normal et spéculant que la P4 peut ne pas avoir un effet direct sur la relâche de la PGF  $2\alpha$ . En outre, les résultats d'une étude faite sur des vaches supplémentées rapporte que l'augmentation de P4 post-fertilisation (CIDR) entraîne une désensibilisation des récepteurs de P4 au niveau de l'utérus (considéré comme étant un moment critique pour l'expression des gènes indispensables au développement de l'embryon, la reconnaissance de la gestation ainsi que l'implantation (Okum et *al.*, 2010)) et résulte en une relâche de PGF  $2\alpha$  et donc une augmentation de PGFM.

Le mécanisme par lequel le PGFM affecte négativement le développement des embryons reste encore à élucider. Selon Scenna et *al.* (2004), le PGFM entraîne une diminution de l'interaction cellule-cellule de l'embryon (avant ou pendant la compaction) entraînant une altération de la croissance et différenciation cellulaire et résultant en la mort de l'embryon. La signification pratique de la corrélation négative entre la concentration de PGFM et le nombre d'ET réside dans le fait que plus la concentration sérique et utérine de PGFM au début de la SOV ou à JR, moins il y aura de nombre de TE.

La corrélation positive entre l'IGF-1 sérique à J7 et le nombre d'ET confirme aussi bien le rôle de l'IGF-1 durant la maturation folliculaire que dans la croissance et le développement de l'embryon. L'IGF-1 joue un rôle durant la transition des follicules de 2mm en follicule

de 5 mm (Monget et Bondy, 2000). Chez les vaches suroovulées, la relâche précoce de la LH fait que les follicules n'ont pas le temps d'acquérir une maturation adéquate, aboutissant à une anovulation (D'Occhio et *al.*, 1999). Dans cette circonstance, l'IGF-1 favorise la maturation folliculaire en accélérant leur mitose (Sakaguchi et *al.*, 2002). En outre, la qualité de l'ovocyte joue un rôle important dans la capacité de l'embryon à se développer (Greve et *al.*, 1995). Par déduction, il peut être avancé que la présence d'une concentration sérique élevée d'IGF-1 au moment de la SOV pourrait améliorer la croissance et la maturation des follicules qui seront par la suite fécondés et deviendront des ET.

La bactériologie et la cytologie semble ne pas affecter le nombre d'ET qui est en désaccord avec les études de William et *al.* (2005, 2007) rapportant une association négative entre la présence de germe reconnu pathogènes et potentiellement pathogènes et le taux de gestation d'une part et une association entre la présence de ces germes et la présence d'une inflammation utérine d'autre part. Ce désaccord pourrait être dû à différence du moment durant la quelle les études ont été réalisées. Les études de William et *al.* (2005 et 2007) ont été faite entre 20 et 50 jours postpartum tandis que la présente étude a été faite entre 80 à 185 JEL. Cependant, le fait que les 3 vaches qui avaient *Arcanobactérium pyogenes* (bactérie reconnu pathogènes pour l'utérus (William et *al.*, 2005)) soit à J7 ou à JR ne donnaient que des ovules amène à poser une nouvelle hypothèse stipulant que la présence de bactéries reconnus pathogènes au-delà de 80 JEL pourrait affecter le nombre d'ET.

### **Limite de l'étude**

La méthodologie de cette étude ayant comme objectif de déterminer l'effet de la SOV été limitée sur la comparaison des paramètres biochimiques sérique et utérin de vache non-surovulée et surovulée. De plus, comme les nutriments fournis par les sécrétions utérines assurent la survie et le développement de l'embryon; il aurait été intéressant de faire un suivi journalier de l'évolution de la concentration sérique et utérine des paramètres biochimiques à partir de J7 jusqu'à JR. Pourtant, bien qu'un tel suivi aurait été possible au niveau sérique; la présence des embryons 1 jour après l'insémination aurait compliquée le suivi au niveau utérin En outre, l'absence à la fois des données sur l'effet du lavage utérin

au niveau de l'utérus et de technique standard de l'évaluation du contenu des sécrétions utérine font que la variation journalière *in vivo* de la concentration utérine des paramètres biochimiques depuis la fécondation jusqu'à JR est difficile voire impossible à évaluer. C'est pourquoi, pour des raisons économiques et de faisabilité; la mesure de la concentration utérine et sérique des paramètres biochimiques a été limitée à J7 et JR seulement.

### **Perspective**

L'effet de la SOV sur les paramètres biochimiques sérique et utérin et le nombre d'ET de la présente étude méritent d'être validés sur un modèle comparant deux groupes de vaches au même stade physiologique accompagné de l'identification des embryons du groupe contrôle. En outre, comme, le nombre d'ET a été positivement corrélé avec la concentration de P4 et négativement avec la concentration de PGFM, il serait intéressant de faire une challenge *in vitro* de culture embryonnaire dans des concentrations variables de P4 et de PGFM pour; dans un premier temps, déterminer le cut-off entre la concentration de ces 2 paramètres et le développement des embryons et dans un deuxième temps pour pouvoir prédire si il y aura plus ou moins d'ET à la suite d'une SOV.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

La SOV n'a aucun effet sur le statut bactériologique et cytologique de l'utérus, par contre elle entraîne une modification des profils biochimiques surtout utérin que sérique qui affecte le nombre d'ET récolté. Il n'y a pas d'association entre le statut bactériologique et cytologique de l'utérus et le nombre d'ET. Le nombre d'ET a été positivement corrélé avec la concentration sérique d'IGF-1 à J7 et P4 à JR et négativement corrélé avec la concentration utérine et sérique de PGFM à la fois à J7 et JR.

Les résultats de la présente étude suggèrent que le statut bactériologique et cytologique de l'utérus entre 80 à 185 JEL n'affecte pas la production d'ET durant la SOV. En outre, la concentration sérique d'IGF-1 et à la fois la concentration utérine et sérique de PGFM au début de la SOV entre 80 à 185 JEL pourraient être utilisées pour prédire la réponse de la SOV en termes de nombre d'ET.



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, H., Onodera, M., Sugawara, S. 1995a. Immunological detection and characterization of an estrus-associated antigen in the goat oviduct. *J. Exp. Zool.* 272 : 134-141.
- Adams, G.P., Kot, K., Smith, C.A., Ginther, O.J. 1993. Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 30 : 259-271.
- Adams, G.P. 1994. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: Implications for synchronization and superstimulation, *Theriogenology* 41 : 19-24.
- Adams, G.P., Jaiswal, R., Singh, J., Malhi, P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 69: 72-80.
- Albihn, A., Gustafson, H., Rodriguez-Martinez, H. 1991. Maternal influence on the early development of asynchronously transferred bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 24: 25-35.
- Armstrong, D.G., Gong, J.G., Gardner, J.O., Baxter, G., Hogg, C.O., Webb, R. 2002. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of shortterm changes in dietary intake. *J. Reprod. Fertil.* 123 : 371–378.
- Armstrong, D.T., Recent advances in superovulation of cattle. 1993. *Theriogenology* 39 : 7-24.
- Avery, B., Bak, A., Schmidt, M. 1989. Differential cleavage rates and sex determination in bovine embryos. *Theriogenology* 32 : 189-147.
- Ayalon, N. 1978. A review of embryonic mortality in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 54 : 483-493.

Barros, C.M., Betts, J.G., Thatcher, W.W., Hansen, P.J. 1992. Possible mechanisms for reduction of circulating concentrations of progesterone by interferon-a in cows: effects on hyperthermia, luteal cells, metabolism of progesterone and secretion of LH. *J. Endoc.* 133 : 175–182.

Baruselli, P. S., de SaFilho, M.F., Martins, C.M., Nasser, L.F., Nogueira, M.F.G., Barros, C.M. et al. 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 65 : 77-88.

Bassett, J.M. 1991. Symposium on recent research in the placenta. *Proceedings of the Nutrition Society* 50 : 311–319.

Bauersachs, S., Ulbrich, S.E., Gross, K., Schmidt, S.E.M., Meyer, H.H.D., Wenigerkind, H. et al. 2006. Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. *J. Reprod. Fertil.* 132 : 319–331.

Bavister, B.D. 2000. Interactions between embryos and the culture milieu. *Theriogenology* 53 : 619–626.

Beker, A.R., Colenbrander, B., Bevers, M.M. 2002. Effect of 17beta-estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology* 58 : 1663–1673.

Beker-Van Woudenberg, A.R., Van Tol, H.T., Roelen, B.A., Colenbrander, B., Bevers, M.M. 2004. Estradiol and its membrane-impermeable conjugate (estradiol-bovine serum albumin) during in vitro maturation of bovine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation, cytoskeleton, and embryo quality. *Biol. Reprod.* 70 : 1465–1474.

- Benyei, B., Gaspard, A., Komlosi, I., Pecs, A. 2004. Repeatability and Heritability of Ovulation Number and Embryos in Dam-daughters Pairs in Superovulated Holstein-Friesian Cows. *Reprod. Dom. Anim.* 39 : 99–102.
- Bergfelt, D.R., Lightfoot, K.C., Adams, G.P., 1994. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology* 42 : 895-907.
- Bernard, C., Valet, J.P., Beland, R., Lambert, R.D., 1984. Prediction de l'ovulation chez le bovin par dosage rapide de la LH plasmatique et observation de l'ovulation par laparoscopie. *Can. J. Comp. Med.* 48, 97-101.
- Bindon, B.M., Piper, L.P., Cahill, L.P., Draincourt, M.A., O'Shea, T. 1986. Genetic and hormonal factors affecting superovulation. *Theriogenology* 25 : 53-70.
- Block, J. 2007. Use of insulin-like growth factor-1 to improve post-transfer survival of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology* 68 : S49–S55.
- Block, J., Hansen, P.J. 2007. Interaction between season and culture with insulin-like growth factor-1 on survival of in vitro produced embryos following transfer to lactating cows. *Theriogenology* 67 : 1518–1529.
- Block, J., Wrenzycki, C., Niemann, H., Herrmann, D., Hansen, P.J. 2008. Effects of insulin-like growth factor-1 on cellular and molecular characteristics of bovine blastocyst produced in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 75 : 895–903.
- Bó, G. A., Baruselli, P. S., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tríbulo, R. et al. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 57 (1) : 53-72.

- Bó, G.A., Adams, G.P., Caccia, M., Martinez, M., Pierson, R.A., Mapletoft, R.J. 1995. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 39 : 193-204.
- Bó, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A., Mapletoft, R.J. 1996. Effect of progestogen plus E-17 $\beta$  treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology* 45:897-910.
- Bó, G.A., Chesta, P., Nasser, L.F., Caccia, M., Martinez, M., Pierson, R.A. et al. 2005. Efficiency of programs that control follicular development and ovulation for the donor superovulation without estrus detection. In: *Proc. Joint. Mtg. Am. Embryo Trans. Assoc. & Can. Embryo Trans. Assoc. Minneapolis, MN.* 10-19.
- Bondurant, R.H. 1999. Inflammation in the bovine female reproductive tract. *J. Anim. Sci.* 77 (2) : 101-110.
- Bonnett, B.N., Martin, S.W., Gannon, V.P., Miller, R.B., Etherington, W.G. 1991. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. III. Bacteriological analysis and correlations with histological findings. *Can. J. Vet. Res.* 55:168–773.
- Bousquet, D., Lamothe, P., Guay, P. 1976a. L.D.H. and L.D.H. isoenzymes of the intra-uterine secretions of the cow during the estrous cycle. *Theriogenology* 5 (4): 189-196.
- Bungartz, L., Niemann, H. 1994. Assessment of the presence of dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J. Reprod. Fertil.* 101 : 583-591.
- Butler, W.R., 1998. Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 81 : 2533–2539.

Butler, W.R., Calaman, J.J., Beam, S.W. 1996. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 74 : 858–865.

Butler, W.R., 2001. Nutritional effects on resumption of ovarian cyclicity and conception rate in postpartum dairy cows. *Anim. Sci.* 26 : 133-145.

Callaghan, B.D., King, G.J. 1980. Determination of the fertilization rate of A.I. sires. *Theriogenology* 14 : 403-410.

Callesen, H., Greve, T., Hyttel, P. 1988. Preovulatory evaluation of the superovulatory response in donor cattle. *Theriogenology* 30 (3) : 477-488.

Canfield, R.W., Sniffen, C.J., Butler, W.R. 1990. Effects of excess degradable protein on postpartum reproduction and energy balance in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 73 : 2342–2349.

Cetica, P., Pintos, L., Dalvit, G., Beconi, M. 2002. Activity of key enzymes involved in glucose and triglyceride catabolism during bovine oocyte maturation *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 124 : 675-681.

Cushman, R.A., DeSouza, J.C., Hedgpeth, V.S., Britt, J.H. 1999. Superovulatory response of one ovary is related to the micro- and macro-scopic population of follicles in the contralateral ovary of the cow. *Biol. Reprod.* 60 : 349–54.

D’Occhio, M.J., Jillella, D., Lindsey, B.R. 1999. Factors that influence follicle recruitment, growth and ovulation during ovarian superstimulation in heifers: opportunities to increase ovulation rate and embryo recovery by delaying the exposure of follicles to LH. *Theriogenology* 51 : 9–35.

de Vries, A., Risco, C. A. (2005). Trends and seasonality of reproductive performance in Florida and Georgia dairy herds from 1976 to 2002. *J. Dairy Sci.* 88 : 3155–3165.

De Loos, F.A.M., Bevers, M.M., Dieleman, S.J., Kruip, Th.A.M. 1991a. Morphology of preovulatory bovine follicles as related to oocyte maturation. *Theriogenology* 35 : 527-536.

Del Vecchio, R.P., Matsas, D.J., Inzana, T.J., Sponenberg, D.P., Lewis, G.S. 1992. Effect of intrauterine bacterial infusions and subsequent endometritis on prostaglandin F2a metabolite concentrations in postpartum beef cows. *J. Anim. Sci.* 70:3158–162.

Dominko, T., Firsti, N.L. 1997. Relationship between the maturational state of oocytes at the time of insemination and sex ratio of subsequent early bovine embryos. *Theriogenology* 47 : 1041-1050.

Donaldson, L.E., 1984b. Cattle breed as a source of variation in embryo transfer. *Theriogenology* 21 : 1013-1018.

Donaldson, L.E., 1984a. The effect of the age of the donor cow on embryo production. *Theriogenology* 21, 963-967.

dos Santos, R.M., Goissis, M.D., Fantini, D.A., Bertan, C.M., Vasconcelos, J.L.M., Binelli, M. 2009. Elevated progesterone concentrations enhance prostaglandin F2  $\alpha$  synthesis in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 114 : 62–71.

Edwards, L.M., Rahe, C.H., Griffin, J.L., Wolfe, D.F., Marple, D.N., Cummins, K.A. et al. 1987. Effect of transportation stress on ovarian function in superovulated Hereford heifers. *Theriogenology* 28 : 291-299.

Ellington, J.E. 1991. The bovine oviduct and its role in reproduction: a review of the literature. *Cornell Vet.* 81 : 313–28.

Elrod, C.C., Van Amburgh, M., Butler, W.R. 1993. Altérations of pH in response to increased dietary protein in cattle in cattle are unique to the uterus. *J. Anim. Sci.* 71 : 702-706.

Erickson, B.H. 1966. Development and senescence of the post natal bovine ovary. *J. Anim. Sci.* 25 : 800-805.

Ferguson, J.D., Galligan, D.T., Blanchard, T., Reeves, M. 1993. Serum urea nitrogen and conception rate: the usefulness of test information. *J. Dairy Sci.* 76 : 3742–3746.

Ferguson, E.M., Leese, H.J. 1999. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *J. Reprod. Fertil.* 116 : 373-378.

Foote, R.H., Ellington, J.E. 1988. Is a superovulated oocyte normal?. *Theriogenology* 29 (1) : 111-123.

Fortune, J.E. 1994. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.* 50 : 225-230.

Fortune, J.E. 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 78 : 135–163.

Fricke, P.M., Kirsch, J.D., Reynolds, L.P., Redmer, D.A. 1994. Studies of FSH-P induced follicular growth in cows. *Theriogenology* 42 : 43–53.

Fukushima, M., Fukui, Y. 1985. Effects of gonadotropins and steroids on the subsequent fertilizability of extrafollicular bovine oocytes cultured in-vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 9 :323-332.

Garcia, A., Salaheddine, M. 1998. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. *Theriogenology* 50 : 575-585.

Garcia-Bojalil, C. M., Staples, J. C. R., Thatcher, W. W. 1994. Protein Intake and development of Ovarian Follicles and Embryos of Superovulated nonlactating dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 77 : 2537-2548.

Gibbons, J.R., Wiltbank, M.C., Ginther, O.J. 1997. Relationship between follicles greater than 4 mm and the follicle stimulating hormone surge in heifers. *Biol. Reprod.* 57 : 1066-1073.

Gilad, E., Meidan, R., Berman, A., Graber, Y., Wolfemson, D. 1993. Effect of heat stress on tonic and GnRH induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows. *J. Reprod. Fertil.* 99 : 315-321.

Ginther, O.J., Knopf, L., Kastelic, J.P. 1989. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fertil.* 87 : 223-230.

Ginther, O.J., Bergfelt, D.R., Beg, M.A., Kot, K. 2001. Follicle selection in cattle : role of luteinizing hormone. *Biol. Reprod.* 64 : 197-205.

Glencross, R.G., Pope, G.S., 1981. Concentrations of oestradiol-17 $\beta$  and progesterone in the plasma of dairy heifers before and after cloprostenol-induced and natural leutolysis and during early pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.* 4 : 93-106.

Gliedt, D.W., Rosenkrans, C.F., Rorie, R.W., Munyon, A.L., Pierson, J.N., Miller, G.F. et al. 1996. Effect of media, serum, oviductal cells, and hormone during maturation on bovine embryo in vitro. *J. Dairy Sci.* 79 : 536-42.



Glister, C., Groome, N.P., Knight, P.G. 2006, Bovine follicle development is associated with divergent changes in activin-A, inhibin-A and follistatin and the relative abundance of different follistatin isoforms in follicular fluid. *J. Endoc.* 188 : 215–225.

Gong, J.G., Armstrong, D.G., Baxter, G., Hogg, C.O., Garnsworthy, P.C., Webb, R. 2002. The effect of increased dietary intake on superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology* 57 : 1591–602.

Gonzalez, A., Wang, H., Carruthers, D.T., Murphy, B.D., Mapletoft, R.J. 1994a. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin : Effects of dose and antipregnant mare serum gonadotrophin serum. *Can. Vet. J.* 35 : 158-162.

Gonzalez A., Lussier J.G., Carruthers T.D., Murphy B.D., Mapletoft R.J. 1990. Superovulation of beef heifers with Folltropin. A new FSH preparation containing reduced LH activity. *Theriogenology* 33 : 519-529.

Gott, A.L., Gray, S.M., James, A.F., Leese, H.J. 1988. The mechanism and control of rabbit oviduct fluid formation. *Biol. Reprod.* 39: 758–763.

Graham, J.D., Clarke, C.L. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr. Rev.* 18 : 502–519.

Grasso, F., Guilbalt, L.A., Roy, G.L., Lussier, J.G. 1989. Ultrasonographic determination of ovarian follicular development in superovulated heifers pretreated with FSH-P at the beginning of the oestrous cycle. *Theriogenology* 31 : 1209-1220.

Green, M.P., Hunter, M.G., Mann, G.E. 2005. Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 88 : 179 - 189.

Greve, T., Callesen, H., Hyttel, P., Høier, R., Assey, R. 1995. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 43 : 41–50.

Grippo, A.A., Henault, M.A., Anderson, S.H., Killian, G.J. 1992. Cation concentrations in fluid from the oviduct ampulla and isthmus of cows during the estrous cycle. *J. Dairy Sci.* 75 : 58–65.

Guérin, P., Menezo, Y. 1995. Hypotaurine and taurine in gamete and embryo environments: de novo synthesis via the cysteine acid pathway in oviduct cells. *Zygote* 3 : 333-343.

Guilbault, L.A., Grasso, F., Lussier, J.G., Rouillier, P., Matton, P. 1991. Decreased superovulatory response in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *J. Reprod. Fertil.* 91 : 81-89.

Hansel, W., Convey E.M. 1983. Physiology of the estrous cycle. *J. Anim. Sci.* 57 : 404-424.

Hansen, P.J., Soto, P., Natzke, R.P. 2004. Mastitis and fertility in cattle—possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. *Am. J. Reprod. Immunol.* 51:294–301

Hasler, J.F., 1992. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 75 : 2857-2879.

Herrler, A., Elsaesser, F., Niemann, H. 1990. Rapid milk progesterone assay as a tool for the selection of potential donor cows prior to superovulation. *Theriogenology* 33; 2 : 415-422.

Hisataka I., Hashimoto, S., Ohota, M., Kimura, K., Shibano, K., Miyake, M. 2004. Effects of follicle size and electrolytes and glucose in maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 127 : 159-164.

Hockett, M.E., Rohrbach, N.R., Schrick, F.N. 2004. Altération in embryo development in progestogen-supplemented cows administred prostaglandin F 2 $\alpha$ . *Prostaglandins and Other Lipid Mediat.* 73 : 227-236.

Hodgen, G.D. 1982. The dominant ovarian follicle. *Fertil. Steril.* 38 : 281-300.

Huhtinen, M., Rainio, V., Alato, J., Bredbacka, P., Maki-Tanila, A. 1992. Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle superovulated cows. *Theriogenology* 37 : 457-463.

Hugentobler, S.A., Morris, D.G., Sreenan, J.M., Diskin, M.G. 2007b. Ion concentrations in oviduct and uterine fluid and blood serum during the estrous cycle in the bovine. *Theriogenology* 68 : 538-548.

Hugentobler, S.A., Humpherson, P.G., Leese, H.J., Sreenan, J.M., Morris, D.G. 2008. Energy substrates in bovine oviduct and uterine fluid and blood plasma during the estrous cycle. *Mol. Reprod. Dev.* 75 : 496-503.

Hunt, J.S., Chen, H.L., Miller, L. 1996. Tumor necrosis factors: pivotal components of pregnancy? *Biol. Reprod.* 54 : 554-562.

Hyttel, P., Callesen, H., Greve, T., Schmidt, M. 1991. Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. *Theriogenology* 35 : 91-107.

Johnson, S.K., Jordon, J.E., Dean, R.G., Page, R.D. 1991. The quantitation of bovine embryo viability using a bioluminescent assay for lactate dehydrogenase. *Theriogenology* 425-433.

Kafi, M., McGowan, M.R., Jillella, D., Fenwick, D., Johnston, S.D., Kirkland, P.D. 1997. The effect of bovine pestivirus on ovulation in superovulated friesland heifers. *Theriogenology* 48 : 986-996.

Kafi, M., McGowan. 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 48 : 137-157.

Kaneko, H., Kishi, H., Watanabe, G., Taya, K., Sasamoto, S., Hasegawa, Y. 1995. Changes in plasma concentrations of immunoreactive inhibin, estradiol and FSH associated with follicular waves during the estrous cycle of the cow. *J. Reprod. Dev.* 41 : 311-320.

Karsch, F.J., Battaglia, D.F., Breen, K.M., Debus, N., Harris, T.G. 2002. Mechanism for ovarian cycle disruption by immune inflammatory stress. *Stress* 5 : 101-112.

Kastelic, J. P., Ko, J.C.H, Ginther, O. J. 1990b. Suppression of dominant and subordinate ovarian follicles by a proteinaceous fraction of follicular fluid in heifers. *Theriogenology* 34 : 499-509.

Katagiri, S., Ma, S., Ho Yuen, B., Moon, I.S. 1997. Role for insulin-like growth factor I in the regulation of electrolyte composition of uterine luminal fluid. *J. Reprod. Fertil.* 109 : 115-120.

Keller, D.S., Teepker, G. 1990. The effect of variability in response to superovulation on donor cow selection differentials in nucleus breeding schemes. *J. Dairy Sci.* 73: 549-554.

Kelly, P., Duffy, P., Roche, J.F., Boland, M.P. 1997. Superovulation in cattle: effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Anim. Reprod. Sci.* 46 : 1–14.

Killian, G.J. 2004. Evidence for the role of oviduct secretions in sperm function, fertilization and embryo development. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83 141–153.

Kim, I.H., Son, D.S., Yeon, S.H., Choi, S.W., Park, S.B., Ryu, I.S., et al. 2001. Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. *Theriogenology* 55 : 937– 945.

Kimura, K., 2005. Implantation occurs approximately 30 days after fertilization in cattle. *Journal of Mammalian Ova Research* 22 : 101–118.

King, W.A., Yadav, B.R., Xu, K.P., Picard, L., Sirard, M.A., Verini Suplizi, A. et al. 1991. The sex ratios of bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Theriogenology* 36 : 779-788.

Kindahl, H., Lindell, J.O., Edqvist, L.E. 1981. Release of prostaglandin F<sub>2</sub> during the oestrous cycle. *Acta Vet. Scand.* 77 : 143–58.

Kirkland, P.D., Hart, K.G., Moyle, A., Rogan, E. 1990. The impact of pestivirus on an artificial breeding program for cattle. *Aust. Vet. J.* 67 : 261-263.

Koji, Y., Abas Mazni, O., Takahide, T., Harumichi, Y., Kenji, S. 1997. Differential patterns of blastulation in bovine morulae cultured in synthetic oviduct fluid medium containing FCS or BSA. *Theriogenology* 48 : 997–1006.

Krisher, R.L., Bavister, B.D. 1998. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology* 49: 103-114.

Kulick, L.J., Bergfelt, D.R., Kot, K., Ginther, O.J. 2001. Follicle sélection in cattle : deviation and codominance within sequential waves. *Biol. Reprod.* 65 : 839- 846.

Lamming, G.E. and Mann, G.E. 1995. Control of endometrial oxytocin receptor and prostaglandin F2  $\alpha$  production in cow by progesterone and oestradiol. *J. Reprod. Fertil.* 103 : 69-73.

Lamming, G.E., Darwash, A.O. 1998. The use of milk progesterone profiles to characterise components of subfertility in milked dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 52 : 175-190.

Lamothe, P., Guay, P., Tremblay, A. Blood glucose and endometrial glucose secretion in 2 groups of cows one which is affected by infertility sine materia]. *Can. Vet. J.* 13 (2): 29-32.

Landau, S., Braw-Tal, R., Kaim, M., Bor, A., Bruckental, I. 2000. Preovulatory follicular status and diet affect the insulin and glucose content of follicles in high yielding dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 64 : 181-197.

Lauria, R.M.A. 1991. Oviduct ampullary epithelium contributes a glycoprotein to the zona pellucida, perivitelline space and blastomeres membrane of sheep embryos. *Eur. J. Basic Appl. Histochem.* 35 : 383-392.

Laurincik, J., Grafenau, O., Hyttel, P., Greve, T. 1993a. Character of preovulatory follicles and oocytes after different superovulatory treatments in heifers. *Theriogenology* 39 : 545-551.

LeBlanc, S.J., Duffield, T.F., Leslie, K.E., Bateman, K.G., Keefe, G.P., Walton, J.S., et al. 2002. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:2223–2236.

Lefebvre, R.C., Carrière, P.D., Lussier, J.G. Folliculogenèse chez la vache. In : Médecin vétérinaire du Québec. 2007. 36; (4) : 132-138.

Leese, H.J. 1995. Metabolic control during preimplantation mammalian development. Hum. Reprod. Update 1 : 63–72.

Leese, H.J. 1988. The formation and function of oviduct fluid. J. Reprod. Fertil. 82 : 843–856.

Leese, H.J. 2002. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. BioEssays 24 : 845-849.

Lemaster, J.W., Seals, R.C., Hopkins, F.M., Schrick, F.N. 1999. Effects of administration of oxytocin on embryonic survival in progesterone supplemented cattle. Prostaglandins 57 : 259–68.

Lerner, S. P., Thayne, W. V., Baker, R. D., Henschen, T., Meredith, S., Inskip, E. K. et al. 1986. Age, Dose of FSH and Other Factors Affecting Superovulation in Holstein Cows. J. Anim. Sci. 63:176-183.

Leroy, J.L., Opsomer, G., Van Soom, A., Goovaerts, I.G., Bols, P.E. 2008. Reduced fertility in high yielding dairy cows : are the oocyte and embryo in danger? Part I : The importance energy balance and altered corpus luteum function to the reproduction of oocyte and embryo quality in high yielding dairy cows. Reprod. Domest. Anim. 48; 5 : 612-622.

Liess, B., 1990. Bovine viral diarrhea virus. In: Horzenic (Ed.), Virus infections of vertebrates (Virus infections of ruminants). 247-266.

Looney, C.R. 1986. Superovulation in beef females. Proc. 5th Ann. Conv. AETA, Fort Worth, Texas, pp. 16-29.

- Lucy, M.C., Bilby, C.R., Kirby, C.J., Yuan, W., Boyd, C.K. 1999. Role of growth hormone in development and maintenance of follicles and corpora lutea. *J. Reprod. Fertil.* 54 : 49-59.
- Lucy, M.C. 2000. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin like growth factors in cattle. *J. Dairy Sci.* 83 : 1635-1647.
- Lucy, M. C. 2001. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J. Dairy Sci.* 84 : 1277–1293.
- Lussier, J.G., Matton, P., Duffour, J.J. 1987. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J. Reprod. Fertil.* 81 : 301-307.
- Lussier, J.G., Matton, P., Guilbault, L.A., Grasso, F., Mapletoft, R.J., Carruthers, T.D. 1994. Ovarian follicular development and endocrine response in follicular fluid treated and hemi ovariectomized heifers. *J. Reprod. Fertil.* 102 : 95-105.
- Macmillan, K.L., Thatcher, W.W. 1991. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol. Reprod.* 45:883-889.
- Makarevich, A.V., Markkula, M. 2002. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. *Biol. Reprod.* 66 : 386–392.
- McCracken, J.A., Custer, E.E., Lamsa, J.C. 1999. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol. Rev.* 79 : 263–323.
- Malayer, J.R., Hansen, P.J., Gross, T.S., Thatcher, W.W. 1990. Regulation of heat shock-induced alterations in the release of prostaglandins by the uterine endometrium of cows. *Theriogenology* 34 : 219 –230.



Mann, G.E., Lamming, G.E. 2001. Relationship between the maternal endocrine environment, early embryo development and the inhibition of the luteolytic mechanism in the cow. . J. Reprod. Fertil. 121 : 175–180.

Mann, G.E., Lamming, G.E., Robinson, R.S., Wathes, D.C. 1999. The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. J. Reprod. Fertil. Suppl 54 : 317–328.

Mann, G.E., Fray, M.D., Lamming, G.E. 2006. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-s production in the cow. The Vet. J. 171 : 500-503.

Mapletoft, R.J. 1985. Embryo transfer in the cow: General procedures. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 4 : 843-858.

Mapletoft, R.J. 2006. Bovine embryo transfert. In: IVIS Reviews in Veterinary Medicine, I.V.I.S. (Ed.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)) R0104.1106.

Mapletoft, R.J., Bó, G.A., Baruselli, P.S. 2009. Control of ovarian function for assisted reproductive technologies in cattle. Anim. Reprod. 6; 1 : 114-124.

Mapletoft, R.J., Bennett-Steward, K., Adams, G.P. 2002. Recent advances in the superovulation of cattle. Reprod . Nutr. Dev. 42:601-611.

Martinez, M.F., Adams, G.P., Bergfelt, D., Kastelic, J.P., Mapletoft, R.J. 1999. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in heifers. Anim. Reprod. Sci. 57:23-33.

Massey, J.M., Oden, A.J., 1984. No seasonal effect on embryo donor performance in southwest region of USA. *Theriogenology* 21 : 196-217.

Mateus, L., Lopes da Costa, L., Diniz, P., Ziecik, A.J. 2003. Relationship between endotoxin and prostaglandin (PGE2 and PGFM) concentrations and ovarian function in dairy cows with puerperal endometritis. *Anim. Reprod .Sci.* 76 : 143-154.

Matsuyama, K., Miyakoshi, H., Y. Fukui. 1993. Effect of glucose levels during the in vitro culture in synthetic oviduct fluid medium on in vitro development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology* 40; 3 : 595-605.

McGee, E.A., Hsueh, A.J. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicle. *Endocr. Rev.* 21 : 200-214.

McGowan, M.R., Kirkland, P. 1995. Early reproduction loss due to bovine pestivirus infection. *Br. Vet. J.* 15; 1 : 263-210.

McNutt, T., Rogowski, L., Vasilatos-Younken, R., Killian, G. 1992. Adsorption of oviductal fluid proteins by the bovine sperm membrane during in vitro capacitation. *Mol. Reprod. Dev.* 33 : 313-323.

Ménézo, Y. 1985. Milieux de culture pour la fécondation in vitro. *Ann. Biol. Clin.* 43 : 27-31.

Milvae, R.A., Hinckley, S.T., Carlson, J.C. 1996. Luteotrophic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology* 45 : 1327-1349.

Misra, A.K. 1993. Superovulation and embryo transfer in buffalo: Progress, problems and future prospects in India. *Buffalo Journal* 1:13-24.

Misra, A.K., Mutha Rao, M., Kasiraj, R., Rangareddy, N.S., Pant, H.C. 1999b. Bull specific effect on fertilization rate and viable embryo recovery in the superovulated buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 52 (4): 701-707.

Miyamoto, Y., Skarzynski, D.J., Okuda, K. 2000. Is tumor necrosis factor a trigger for the initiation of endometrial prostaglandin F2 release at luteolysis in cattle? *Biol. Reprod.* 62 : 1109-15.

Monget, P., Bondy, C. 2000. Importance of the IGF system in early folliculogenesis. *Mol. Cel. Endoc.* 163 : 89-93.

Monniaux, D., Chupin, D., Saumande, J. 1983. Superovulatory response of cattle. *Theriogenology* 19 : 55-81.

Moor, R.M., Kruip Th.A.M., Green D. 1984. Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation? *Theriogenology* 21 : 103-116.

Murakami, S., Miyamoto, Y., Skarzynskia, D.J., Okudab, K. 2001. Effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  on secretion of prostaglandins E2 and F2 in bovine endometrium throughout the estrous cycle. *Theriogenology* 55 : 1667-1678.

Murphy, L.J., Ballejo, G. 1994. Growth factor and cytokine expression in the endometrium. In *Molecular Biology of the Female Reproductive System* pp 345-377 Ed. JK Findlay. Academic Press, San Diego, CA.

Murphy, B.D., Mapletoft, R.J., Manns, J., Humphrey, W.D. 1984. Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology* 21 : 117-125.

Murphy, B.D., Martinuk, S.D. 1991. Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine Reviews* 12 : 27-44.

Nasser, L., Adams, G.P., Bo, G.A., Mapletoft, R.J. 1993. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology* 40 : 713-724.

Niswender, G.D., Juengel, J.L., Silva, P.J., Rollyson, M.K., McIntush, E.W. 2000. Mechanism controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiology Rev.* 80 : 1-29.

Noseir, W.M.B. 2003. Ovarian follicular activity and hormonal profile during estrous cycle in cows: the development of 2 versus 3 waves. *Reprod. Biol. Endocr.* 1 : 50

Ocon, O.M., Hansen, P.J. 2003. Disruption of bovine oocytes and preimplantation embryos by urea and acidic pH. *J. Dairy Sci.* 86 : 1194–200.

Okuda, K., Miyamoto, Y., Skarzynski, D.J. 2002. Regulation of endometrial prostaglandin F2 $\alpha$  synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. *Dom. Anim. Endoc.* 23 : 255-264.

Okumu, L. A., Forde, N., Fahey, A.G., Fitzpatrick, E., Roche, J. F., Crowe, M. A. et al. 2010. The effect of elevated progesterone and pregnancy status on mRNA expression and localisation of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus. *J. Reprod. Fertil.* 140 : 043-153.

Oliphant, G., Bowling, A., Eng, L.A., Keen, S., Randall, P.A. 1978. The permeability of rabbit oviduct to proteins present in the serum. *Biol. Reprod* 18 : 516-520.

Opsomer, G., Grohn, Y.T., Hertl, J., Coryn, M., Deluyker, H., de Kruif, A. 2000. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. *Theriogenology* 53 : 841–857.

Parr, R.A., Davis, I.F., Fairclough, R.J., Miles, M.A. 1987. Overfeeding during early pregnancy reduces peripheral progesterone concentration and pregnancy rate in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 80 : 317-320.

Pershing, R.A., Lucy, M.C., Thatcher, W.W., Badinga, L. 2002. Effects of BST on oviductal and uterine genes encoding components of the IGF-1 system in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85 : 3260–3267.

Petersson, K.J., Gustafsson, H., Strandberg, E., Berglund, B. 2006. Atypical progesterone profiles and fertility in Swedish dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89 : 2529-2538.

Poyser, N.L. 1995. The control of prostaglandin by the endometrium in relation to luteolysis and menstruation. *Prostaglandin Leukotrienes Essent. Fatty acids* 53 : 147-195.

Pritpal, S.M., Adams, G.P., Mapletoft, R.J., Jaswant Singh. 2007. Oocyte developmental competence in a bovine model of reproductive aging. *J. Reprod. Fertil.* 134 : 233–239.

Pursley, J.R., Mee, M.O., Wiltbank, M.C., 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 $\alpha$  and GnRH. *Theriogenology* 44 : 915-923.

Purwantara, B., Callesen, H., Greve, T. 1994. Characteristics of ovulations in superovulated cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 37 : 1-5.

Pushpakumara, P.G.A., Robinson, R.S., Demmers, K.J., Mann, G.E., Sinclair, K.D., Webb, R. et al. 2002. Expression of the insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine oviduct at oestrus and during early pregnancy. *J. Reprod. Fertil.* 123 : 859–868.

Putney, D.J., Drost, M., Thatcher, W.W. 1988. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between day 1 to 7 postinsemination. *Theriogenology* 30 : 195-209.

Rajakoski, E. 1960. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical and left – right variation. *Acta endocrinol. Suppl.* 34 ; 52 : 1-68.

Rajamahendran, R., Sianangama, P.C. 1992. Effect of human Chorionic Gonadotrophin (hCG) on dominant follicles in cow: accessory corpus luteum formation, progesterone production and pregnancy rates. . *J. Reprod. Fertil.* 95:577-584.

Rhoads, M.L., Gilbert, R.O., Lucy, M.C., Butler, W.R., 2004. Effects of urea infusion on the uterine luminal environment of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87 : 2896–2901.

Rhoads, M.L., Rhoads, R.P., Gilbert, R.O., Toole, R., Butler, W.R. 2006. Detrimental effects of high plasma urea nitrogen levels on viability of embryos from lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 91 : 1 -10.

Richards, J.S., Russell, D.L., Ochsner, S., Espey, L.L. 2002. Ovulation : new dimensions and new regulators of the inflammatory like response. *Ann. Rev. Physiol.* 64 : 69-92.

Roelofs, J.B., Van Eerdenburg F.J.C.M., Soede, N.M., Kemp, B., 2005. Various behavioral signs of oestrous and their relationship with time of ovulation in dairy cattle. *Theriogenology* 63 : 1366–77.

Royal, M.D., Darwash, A.O., Flint, A.P.F., Webb, R., Wooliams, J.A., Lamming, G.E. 2000. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *J. Anim. Sci.* 70 : 487–501.

Ryan, D.P., Prichard, J.F., Kopel, E., Godke, R.A. 1993. Comparing early embryo mortality in dairy cows during hot and cold seasons of the year. *Theriogenology* 39 : 719-737.

Sakaguchi, M., Dominko, T., Yamauchi, N., Leibfried-Rutledge, M.L., Nagai, T., First, N.L. 2002. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors in vitro. *Reprod.* 123 : 135–142.

Sakaguchi, M., Dominko, T., Leibfried-Rutledge, M.L., Nagai, T., First, N.L. 2000. A combination of EGF and IGF-1 accelerates the progression of meiosis in bovine follicular oocytes and fetal calf serum neutralizes the acceleration effect. *Theriogenology* 54 : 1327–1342.

Salamonsen, L.A., Findlay, J.K. 1990. Regulation of endometrial prostaglandins during the menstrual cycle and in early pregnancy. *Reprod. Fertil. Dev.* 2: 443-457.

Scenna, F.N., Edwards, J.L., Rohrbach, N.R., Hockett, M.E., Saxton, A.M., Schrick, F.N. 2004. Detrimental effects of prostaglandin F2  $\alpha$  on preimplantation bovine embryos. *Prostaglandins and other Lipid Mediators* 73 : 215–226.

Schrick, F.N., Inskeep, E.K., Butcher, R.L. 1993. Pregnancy rates for embryos transferred from early postpartum beef cows into recipients with normal estrous cycles. *Biol. Reprod.* 49 : 617–621.

Santos, J.E.P., Cerri, R.L.A., Sartori, R. 2008. Nutritional management of the donor cow. *Theriogenology* 69; 1 : 88-97.

Sartori, R., Sartor-Bergfelt, R., Mertens, S.A., Guenther, J.N., Parrish, J.J., Wiltbank, M.C. 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J. Dairy Sci.* 85 : 2803–2812.

Savio, J.D., Boland, M.P., Roche, J.F. 1990. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Fertil.* 88:581–91.

Savio, J.D., Thatcher, W.W., Badinga, L., de la Sota, R.L. and Wolfenson, D. 1993. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in the cow. . J. Reprod. Fertil. 97 :197-203.

Savio, J.D., Bongers, H., Drost, M., Lucy, M.C., Thatcher, W.W. 1991. Follicular dynamics and superovulatory response in Holstein cows treated with FSH-P in different endocrine states. Theriogenology 35 : 915-929.

Shea, B.F., Janzen, R.E., MC Derman, D.P. 1984. Seasonal variation in response to stimulation and related embryo transfer procedures in Alberta over a nine year period. Theriogenology 21 : 186-195.

Sheldon, I.M. 2004. The postpartum uterus. Vet. Clin. Food Anim. 20 : 569-591.

Sheldon, I.M., Dobson, H. 2004. Postpartum uterine health in cattle. Anim. Reprod. Sci. 82–83:295–306.

Sheldon, I.M., Noakes, D.E., Rycroft, A.N., Dobson, H. 2003. The effect of intrauterine administration of estradiol on postpartum uterine involution in cattle. Theriogenology 59:1357–1371.

Sheldon, I.M., Noakes, D.E., Rycroft, A.N., Pfeiffer, D.U., Dobson H. 2002. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. Reproduction 123:837–45.

Sheldon, I.M., Lewis, G.S., LeBlanc, S., Gilbert, R.O. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. Theriogenology 65 : 1516-1530.

Simmen, F.A., Simmen, R.C.M. 1991. Peptide growth factors and proto-oncogenes in mammalian conceptus development. Biol. Reprod. 44 : 1-5.



Simmen, R.C.M., Ko, Y., Simmen, F.A. 1993. Insulin-like growth factors and blastocyst development. *Theriogenology* 39 : 163—175

Sinclair, K.D., Kuran, M., Gebbie, F.E., Webb, R., McEvoy, T.G. 2000. Nitrogen metabolism and fertility in cattle: II. Development of oocytes recovered from heifers offered diets differing in their rate of nitrogen release in the rumen. *J. Anim. Sci.* 78 : 2670–2680.

Singh, J., Dominguez, M., Jaiswal, R., Adams, G.P. 2004. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology* 62 : 227–243.

Sirard, M.A., Richard, F., Blondin, P., Robert, C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 65 : 126–136.

Sirois, J., Sayasith, K., Brown, A.K., Stock, A.E., Bouchard, N., Doré, M. 2004. Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a account. *Hum. Reprod. Update* 10 : 373–385.

Skarzynski, D.J., Miyamoto, Y., Okuda, K. 2000. Production of prostaglandin F<sub>2</sub> by cultured bovine endometrial cells in response to tumor necrosis factor : cell type specificity and intracellular mechanisms. *Biol. Reprod.* 62 : 1116–1120.

Spearow, J. 1988. Major genes control hormone-induced ovulation rate in mice. *J. Reprod. Fertil.* 82 : 787–797.

Spencer, T.E., Bazer, F.W. 1995. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol. Reprod.* 53 : 1527–1543.

Spicer, L.J., Chamberlain, C.S., Maciel, S.M. 2002. Influence of gonadotropins on insulin- and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production by bovine granulosa cells. *Dom. Anim. Endoc.* 22 : 237–254.

Staros, A.L., Killian, G.J. 1998. In vitro association of six oviductal fluid proteins with the bovine zona pellucida. *J. Reprod. Fertil.* 112 : 131-137.

Stefanello, J.R., Barreta, M.H., Porciuncula, P.M., Arruda, J.N., Oliveira, J.F., Oliveira, M.A. et al. 2006. Effect of angiotensin II with follicle cells and insulin-like growth factor-I or insulin on bovine oocyte maturation and embryo development. *Theriogenology* 66 : 2068–2076.

Sutton, M.L., Gilchrist, R.B., Thompson, J.G. 2003. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum. Reprod. Update* 9 : 35-48.

Sutton-McDowall, M.L., Gilchrist, R.B., Thompson, J.G. 2004. Cumulus expansion and glucose utilization by bovine cumulus-oocyte complexes during *in vitro* maturation: the influence of glucosamine and follicle-stimulating hormone. *Reproduction* 128: 313-319.

Sutton-McDowall, M.L., Gilchrist, R.B. et Thompson, J.G. 2010. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reprod. advance*. Manuscript REP-09-0345.

Taylor, C., Rajamahendran, R. 1991. Follicular dynamics, corpus luteum growth and regression in lactating dairy cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 71 : 61.

Thatcher, W. W., Moreira, F., Santos, J.E., Mattos, R.C., Lopes, F.L., Pancarci, F.M. et al. 2001. Effect of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology* 55 : 75-89.

Thibault, C., Levasseur, M.C. 2001. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Nouv. Éd. ent. Ref. Edn. INRA : Ellipses, Paris.

Vaughan, L.1990. The effects of copper status and FSH on follicle development and fertility in heifers. Ph.D. Thesis. National University of Ireland. Cited in : Roche, J.F., Boland, M.P.1991. Turnover of dominant follicles in cattle of different reproductive states. *Theriogenology* 35 : 81-90.

Velazquez, M.A., Spicer, L.J., Wathes, D.C. 2008a. The role of endocrine insulinlike growth factor-I (IGF-1) in female bovine reproduction. *Dom. Anim. Endoc.* 35 : 325–342.

Violette, M.I., Madan, P., Watson, A.J. 2006. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase regulates tight junction formation and function during mouse preimplantation development. *Dev. Biol.* 289:406–419.

Wall, E., Brotherstone, S., Woolliams, J.A., Banos, G., Coffey, M.P. 2003. Genetic evaluation of fertility using direct and correlated traits. *J. Dairy Sci.* 86 : 4093–4102.

Walton, J.S., Halbert, G.W., Robinson, N.A., Leslie, K.E. 1990. Effects of progesterone and human chorionic gonadotrophin administration five days post-insemination on plasma and milk concentrations of progesterone and pregnancy rates of normal and repeat breeder dairy cows. *Can. J. Vet. Sci.* 54 : 305–308.

Wann, R.A., Randel, R.D. 1990. Effect of uterine manipulation 35 days after parturition on plasma concentrations of 13, 14-dihydro-15-keto prostaglandin F<sub>2</sub> in multiparous and primiparous brahman cows. *J. Anim. Sci.* 68 : 1389–94.

Washburn, S.P., Silvia, W.J., Brown, C.H., McDaniel, B.T., McAllister, A.J. 2002. Trends in reproductive performance in Southeastern Holstein and Jersey DHI herds. *J. Dairy Sci.* 85 : 244–251.

Wasielak, M., Bogacki, M. 2007. Apoptosis inhibition by insulin-like growth factor (IGF)-I during in vitro maturation of bovine oocytes. *J. Reprod. Dev.* 53 : 419–426.

Wathes, D.C., Taylor, V.J., Cheng, Z., Mann, G.E. 2003. Follicle growth, corpus luteum function and their effects on embryo development in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Fertil.* 61 : 219–237.

Watson, A.J., Barcroft, L.C. 2001. Regulation of blastocyst formation. *Front. Biosci.* 6 : D708–D730.

Webb, R., Garnsworthy, P.C., Gong, J.G., Armstrong, D.G. 2004. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *J. Anim. Sci.* 82 : 63–74.

Wiebold, J.L. 1988. Embryonic mortality and the uterine environment in first-service lactating dairy cows. *J. Reprod. Fertil.* 84 : 393-399.

Willey, L.M., Yamami, S., Van Muyden, D. 1986. Effect of potassium concentration, type of protein supplement, and embryo density on mouse preimplantation development in vitro. *Fertil. Steril.* 45 (1) : 111-119.

Williams, E. J., Fischer, D. P., Pfeiffer, D.U., England, G.C.W., Noakes, D.E., Dobson, H. et al. 2005. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology* 63 (1): 102-17.

Williams, E.J., Fischer, D.P., Noakes, D.E., England, G.C.W., Rycroft, A., Dobson, H. et al. 2007. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology* 68 : 549-559.

Wiltbank, M.C., Fricke, P.M., Sangsritavong, S., Sartori, R., Ginther, O.J. 2000. Mechanism that prevent and produce double ovulations in dairy cattle. J. Dairy Sci. 83 : 2998-3007.

Winger, Q.A., de los Rios, P., Han, V.K., Armstrong, D.T., Hill, D.J., Watson, A.J. 1997. Bovine oviductal and embryonic insulin-like growth factor binding proteins: possible regulators of "embryotrophic" insulin-like growth factor circuits. Biol. Reprod. 56 : 1415-1423.

Wolfenson, D., Thatcher, W.W., Badinga, L., Savio, J.D., Median, R., Lew, B.J. et al. 1995. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. Biol.Reprod. 52 : 1106-1113.

Younis, A.I., Brackett, B.G., Fayrer-Hosken, R.A. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. Gamete Res. 23 : 189-201.

Zeitoun, M.M., Rodriguez, H.F., Randel, R.D. 1996. Effect of season on ovarian follicular dynamics in Brahman cows. Theriogenology 45 : 1577-1581.

## ANNEXES

### Annexe I : Concentration des paramètres biochimiques, bactériologie et cytologie du groupe I

Vaches	Compartiment	Glu J7	Glu JR	Urée J7	Urée JR	Ck J7	Ck JR	LDH J7	LDH JR	Prot J7	Prot JR	Na J7	Na JR
7157	sérum	3,6	4	6,62	3,24	101	116	721	758	76,6	66,7	157,2	141,4
	liq ut	3	3,1	0,86	0,56	438	437	84	165	0,21	0,33	143,8	144,4
2662	sérum	4,2	3,8	5,57	4,2	101	285	948	702	68,5	64,8	145,2	139,5
	liq ut	3	3,1	0,15	0,79	331	309	41	120	0,15	0,14	144,5	145
9100	sérum	4,2	4	5,2	2,86	101	83	895	756	65,1	68,6	144,4	138,5
	liq ut	3	3,1	0,41	0,86	92	513	2	183	0,04	0,49	144,3	144,6
8136	sérum	3,6	3,9	4,81	4,1	107	115	1009	692	65,7	68,2	142,9	135,7
	liq ut	3	3,1	0,75	0,82	389	968	49	267	0,22	0,35	144,7	143,1
4619	sérum	3,6	3,9	4,62	3,67	73	159	1133	702	71,3	68	143,7	139,7
	liq ut	3	3	0,75	0,56	380	389	46	117	0,12	0,11	143,7	144,2
6429	sérum	3,7	4	5,16	3,11	101	87	694	769	65,8	69,3	137,5	141,6
	liq ut	3	3,1	0,56	0,6	351	902	66	283	0,2	0,31	143,8	141

**Annexe I** : Concentration des paramètres biochimiques, bactériologie et cytologie du groupe I (suite)

<b>Vaches</b>	<b>Compartiment</b>	<b>K J7</b>	<b>K IA</b>	<b>Cl J7</b>	<b>Cl jr</b>	<b>E2 J7</b>	<b>E2 jr</b>	<b>P4 J7</b>	<b>P4 JR</b>	<b>Pgfm J7</b>	<b>Pgfm JR</b>	<b>Bact J7</b>	<b>Bact JR</b>	<b>Cytol J7</b>	<b>Cytol JR</b>
7157	sérum	4,67	4,65	100,3	103,6	40,2	38,9	1,6	1,8	54,6	61,4				
	liq ut	5,61	5,74	138,5	140	209	204	<0,2	0,5	51,9	58,7	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
2662	sérum	4,27	4,28	99,3	100,1	24,2	163	1,8	5,7	50,4	60,9				
	liq ut	5,7	5,95	138,7	140,4	208	146	<0,2	0,6	55,3	63,2	Négatif	Négatif	Négatif	Positif
9100	sérum	4,43	4,35	98,9	98,2	20	169	4,2	2,9	53,1	75,6				
	liq ut	5,56	5,83	139,8	139,8	191	207	0,2	0,4	59,3	73,9	Négatif	Négatif	Positif	Négatif
8136	sérum	4,54	4,18	95,8	97,7	110	135	1,5	3	53,5	70,2				
	liq ut	5,64	5,99	138,7	138	201	211	0,2	0,7	49,2	72,4	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
4619	sérum	4,39	4,15	99,3	101,9	25,9	116	0,3	2	51,6	72,9				
	liq ut	5,59	5,69	137,6	140	242	192	0,3	0,7	49,7	70,4	Négatif	Négatif	Négatif	Positif
6429	sérum	4,41	4,48	95,2	102,5	53,8	47,6	2,8	2,3	50,3	54,7				
	liq ut	5,65	4,3	137,9	141	202	224	0,4	0,5	53,8	59,6	Négatif	Négatif	Positif	Négatif
7818	sérum	7,39	4,55	100,7	95,5	89,2	42,1	2,6	0,9	63,9	67,2				
	liq ut	5,55	5,8	138	140,3	183	219	0,2	0,5	65,1	68,4	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif

**Annexe II : Concentration des paramètres biochimiques, bactériologie et cytologie du groupe II**

<b>Vaches</b>	<b>Nbr Embryons</b>	<b>Compartiment</b>	<b>Glu J7</b>	<b>Glu JR</b>	<b>Urée J7</b>	<b>Urée JR</b>	<b>Ck J7</b>	<b>Ck JR</b>	<b>LDH J7</b>	<b>LDH JR</b>	<b>Prot J7</b>	<b>Prot JR</b>	<b>Na J7</b>	<b>Na JR</b>
2543	1	sérum	3,6	4,2	3,86	4,69	85	92	748	903	75	72,2	143,3	140,7
		liq ut	0,2	0,3	0,29	0,35	208	190	45	69	0,13	0,12	149	149,6
4303	0	sérum	3,8	4,9	4,48	5,26	216	213	713	1009	77,9	70,4	138,5	141,2
		liq ut	0,3	0,4	0,19	0,3	285	397	82	157	0,22	0,3	146,3	148,7
1151	14	sérum	4,7	4,7	8,29	6,11	827	143	1199	1184	77,4	51,8	126,8	150,1
		liq ut	0,3	0,3	0,43	0,25	395	385	91	120	0,17	0,14	146,6	147
1709	1	sérum	7,2	6	7,2	4	166	224	1634	1098	45,4	69,6	143,9	140,7
		liq ut	0,2	0,3	0,28	0,29	624	120	136	39	0,17	0,07	148,2	143,6
185	10	sérum	5,8	6	7,58	5,5	174	334	1432	1218	62,4	56,3	126,3	134,2
		liq ut	0,4	0,3	0,39	0,26	286	101	19	41	0,24	0,1	129,3	144,1
3301	9	sérum	3,5	3,7	6,22	5,72	88	218	1349	1348	70,2	74,1	142,4	139,6
		liq ut	0,3	0,2	0,35	0,25	397	18	83	13	0,19	0,16	146,3	143,6
978	13	sérum	4,2	4,6	5,08	5,33	143	806	1020	1350	78,1	74,9	149,6	138,9
		liq ut	0,2	0,3	0,33	0,19	174	80	27	42	0,12	0,1	149,4	146,9
2994	0	sérum	3,7	3,6	4,72	5,04	116	117	953	1138	70,8	71,6	144,2	135,4
		liq ut	0,3	0,3	0,23	0,33	146	41	45	24	0,11	0,06	144,6	144,3
2245	0	sérum	2,4	3,4	4,33	6,9	72	137	628	1155	68,4	69,2	141,6	140,2
		liq ut	0,4	0,3	0,28	0,26	178	127	36	103	0,15	0,42	138,3	137
3500	1	sérum	4,6	3,3	3,73	4,09	123	76	748	702	75,9	70,4	140,6	135,8
		liq ut	0,3	0,3	0,26	0,29	156	175	54	67	0,17	0,16	146,7	147,9
8040	5	sérum	5,3	3,6	6,11	4,55	146	105	1117	750	69,7	70,7	133,4	141
		liq ut	0,3	0,3	0,35	0,16	191	380	54	178	0,28	0,17	146,6	146,6
2500	0	sérum	4,2	3,6	6,49	5,13	326	198	1426	1159	73	76,1	136,3	153,8
		liq ut	0,2	0,3	0,33	0,3	33	244	11	143	0,08	0,37	150,4	148,6
2989	2	sérum	3,9	2,8	5,43	4,3	134	78	902	787	75,4	66,1	142,3	140,3
		liq ut	0,2	0,3	0,36	0,22	72	314	20	67	0,08	0,09	132,1	149,8
705	0	sérum	3,2	2,4	4,1	4,65	124	84	978	773	67,7	66,3	141,2	141,2
		liq ut	0,2	0,2	0,23	0,22	215	142	35	32	0,13	0,07	147	132,4



**Annexe II : Concentration des paramètres biochimiques, bactériologique et cytologie du groupe II (suite)**

<b>Vaches</b>	<b>Nbr Embryons</b>	<b>Compartiment</b>	<b>K J7</b>	<b>K JR</b>	<b>CI J7</b>	<b>CI JR</b>	<b>E2 J7</b>	<b>E2 JR</b>	<b>P4 J7</b>	<b>P4 JR</b>	<b>Pgfm J7</b>	<b>Pgfm JR</b>	<b>Bact J7</b>	<b>Bact JR</b>	<b>Cytol J7</b>	<b>Cytol JR</b>
2543		sérum	4,22	4,39	104,4	103,4	27,8	107	1,8	11,4	120	118,5				
	1	liq ut	6,47	6,56	154,5	154,7	112	113	0,52	0,41	84,9	115,2	Négatif	Positif	Négatif	Négatif
4303		sérum	4,24	4,64	99,8	101,1	26	52,4	2,6	7,5	80,3	108,3				
	0	liq ut	6,42	6,54	151,5	150,6	157	142	0,64	0,54	83,7	113,4	Négatif	Négatif	Positif	Négatif
1151		sérum	3,43	4,51	88	108,8	37,6	96,3	2,2	31,8	43,4	60,4				
	14	liq ut	6,44	6,43	152	149,4	156	154	0,38	0,47	49,2	68,1	Positif	Négatif	Positif	Négatif
1709		sérum	4,6	5,12	102	101,8	36	20	2,6	19	110,9	125,5				
	1	liq ut	6,56	6,24	153,8	145,6	167	167	0,46	0,37	79,4	107,6	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
185		sérum	3,53	4,62	89,5	98	30,2	95,1	1,9	31,6	45,7	120				
	10	liq ut	5,67	6,56	130,7	146	173	156	0,21	0,68	51,4	70,8	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
3301		sérum	4,76	4,72	101,7	99,6	38,9	38,4	2,9	13,3	44,2	61,9				
	9	liq ut	6,4	6,54	148,4	149,6	168	182	0,7	0,57	49,8	69,7	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
978		sérum	4,54	4,74	109,6	100,9	112	85,1	3,3	16,6	46,4	65,8				
	13	liq ut	6,51	6,39	154,5	149,4	168	164	0,41	0,37	50,9	71,9	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
2994		sérum	4,69	4,66	105,3	98,8	117	78,4	2,8	1,5	127,1	109,5				
	0	liq ut	6,28	6,27	146,7	146,9	180	165	0,52	0,43	80,3	106,3	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
2245		sérum	4,51	4,44	101,2	100,6	89,8	84,1	2,8	0,7	86,4	107,9				
	0	liq ut	5,98	5,86	140	138,6	159	173	0,57	0,2	82,7	107,6	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
3500		sérum	4,44	4,76	102,1	100,4	20	77,9	2	6,6	101,4	115,2				
	1	liq ut	6,42	6,45	148,8	152,6	180	156	0,53	0,31	79,8	100,9	Positif	Négatif	Positif	Négatif
8040		sérum	4,28	4,46	97,8	100,5	76,7	75,2	1,3	12,4	69,9	62				
	5	liq ut	6,39	6,35	148,3	148,5	181	147	0,82	0,59	51,7	75,6	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
2500		sérum	4,45	5,26	99,6	116,5	20	47,8	4,5	4,8	87,6	120,2				
	0	liq ut	7,28	6,45	152,8	153,4	172	177	0,59	0,46	84,9	106,1	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
2989		sérum	4,61	4,47	104,2	101	125	124	2,2	9,7	77,2	87,6				
	2	liq ut	5,79	6,49	136,5	151,5	96,1	161	1,9	0,38	85,3	109,8	Négatif	Positif	Négatif	Négatif
705		sérum	4,89	5,07	102,6	100,7	48,2	28	2,5	5,1	75,2	105,2	Négatif	Positif	Positif	Négatif

**Annexe II : Concentration des paramètres biochimiques, bactériologie et cytologie du groupe II (suite)**

<b>Vaches</b>	<b>Nbr Embryons</b>	<b>Compartiment</b>	<b>Glu J7</b>	<b>Glu JR</b>	<b>Urée J7</b>	<b>Urée JR</b>	<b>Ck J7</b>	<b>Ck JR</b>	<b>LDH J7</b>	<b>LDH JR</b>	<b>Prot J7</b>	<b>Prot JR</b>	<b>Na J7</b>	<b>Na JR</b>
4866	3	sérum	3,9	2,8	5,38	4,59	97	90	990	764	70,4	69,9	139,5	140,4
		liq ut	0,3	0,3	0,19	0,35	40	142	11	30	0,05	0,09	148,6	148,4
5954	0	sérum	2,5	3,2	3,38	3,42	57	70	597	745	74,1	71,4	139	139
		liq ut	0,2	0,3	0,33	0,28	43	37	37	12	0,3	0,16	131,4	149,8
2300	7	sérum	3,5	3,5	4,92	4,82	121	249	688	1027	69,5	77,3	143,1	137,8
		liq ut	0,3	0,2	0,36	0,36	240	113	39	47	0,34	0,09	147,4	138,1
116	0	sérum	4,0	3,1	5,6	4,49	163	124	1122	983	66,2	68,4	143,6	135,1
		liq ut	0,2	0,3	0,29	0,13	167	127	22	127	0,16	0,12	136,1	150,7
2836	2	sérum	5,3	3,9	5,36	4,71	189	167	1094	1187	72,9	81,3	132,9	150
		liq ut	0,3	0,2	0,3	0,17	0,59	159	12	36	0,06	0,07	146,7	142,5
458	0	sérum	6,3	3,4	6,09	4,58	146	130	1300	1007	76,5	78,1	134,7	139,7
		liq ut	0,2	0,3	0,35	0,29	38	87	8	344	0,03	0,04	149,8	148,1
1111	1	sérum	3,4	3,6	5,33	5,22	119	87	726	1049	72,9	64,4	137,7	136,3
		liq ut	0,3	0,2	0,81	0,92	8	65	3	117	0,06	0,11	148,2	147
6985	6	sérum	4,0	3,9	5,01	5,84	100	136	927	964	63,5	63,5	142,1	142,8
		liq ut	0,2	0,3	0,84	0,66	68	294	4	93	0,08	0,07	14,6	146,8
2576	0	sérum	3,6	3,6	4,98	6,76	113	111	1016	1097	65,7	65,1	143,5	144,4
		liq ut	0,3	0,3	0,84	0,73	15	110	1	103	0,09	0,11	147,7	147,5
2390	1	sérum	3,6	3,6	4,53	5,17	76	65	1189	722	71,5	70,3	143,8	143,3
		liq ut	0,3	0,2	0,44	0,07	13	94	0	40	0,14	0,05	147,8	148,2
5302	1	sérum	3,1	3,6	5,88	5,26	93	98	679	716	62,8	66,3	140,3	144,8
		liq ut	0,2	0,3	0,37	0,07	11	123	4	44	0,1	0,08	149	148,6
798	16	sérum	3,1	3,6	4,87	5,34	151	194	785	1137	63,4	66,8	143,1	144,6
		liq ut	0,2	0,2	0,51	0,51	6	152	2	58	0,03	0,04	148	147,4
1924	0	sérum	4,1	4,4	5,04	4,76	97	117	918	952	61,5	63,2	143,5	140
		liq ut	0,2	0,2	0,66	0,59	8	30	8	56	0,05	0,06	147,8	151,1
2859	0	sérum	3,6	3,7	5,56	7,06	120	124	1120	912	65,8	78,3	140,8	147
		liq ut	0,2	0,2	0,44	0,55	13	42	1	71	0,14	0,08	148,4	148,4

**Annexe II : Concentration des paramètres biochimiques, bactériologie et cytologie du groupe II (suite)**

<b>Vaches</b>	<b>Nbr Embryons</b>	<b>Compartiment</b>	<b>K J7</b>	<b>K JR</b>	<b>Cl J7</b>	<b>Cl JR</b>	<b>E2 J7</b>	<b>E2 JR</b>	<b>P4 J7</b>	<b>P4 JR</b>	<b>Pgfm J7</b>	<b>Pgfm JR</b>	<b>Bact J7</b>	<b>Bact JR</b>	<b>Cytol J7</b>	<b>Cytol JR</b>
4866	3	sérum	4,2	4,03	98,3	95,9	67,5	55,8	2,2	11,6	90,3	110,9				
		liq ut	6,44	6,4	150,5	150,4	141	145	0,36	0,42	81,4	104,2	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
5954	0	sérum	4,05	4,65	100	102,1	79,5	56,2	1,2	7,5	109,4	114,5				
		liq ut	6,08	6,85	135,5	151,8	175	155	0,26	0,48	82,9	112,7	Positif	Négatif	Positif	Négatif
2300	7	sérum	4,18	4,33	105,5	102,2	77,8	44,1	1,3	8,3	48,1	55,2				
		liq ut	6,82	5,95	149,4	141,5	174	133	0,48	0,41	52,9	74,4	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
116	0	sérum	4,73	4,7	103,7	99,6	91,6	26,9	2	13,1	81,2	115,2				
		liq ut	6,2	6,53	140,2	156,5	141	160	0,58	0,33	80,3	98,4	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
2836	2	sérum	3,93	4,65	96,6	111,3	85	94,6	1,8	14,2	104,2	117				
		liq ut	6,35	6,13	148,9	147,3	176	167	0,58	0,29	79,5	95,8	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
458	0	sérum	4,07	4,38	95,2	102,5	85,6	79,8	1,6	8,2	61,9	179,6				
		liq ut	6,82	6,78	155,1	149,8	137	199	0,42	0,33	97,9	125,2	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
1111	1	sérum	4,59	4,35	96,8	94,1	59,9	71,2	0,7	9,4	58,7	75,4				
		liq ut	6,5	6,62	147	147,9	188	143	<0,2	<0,2	59,4	70,2	Négatif	Négatif	Positif	Négatif
6985	6	sérum	4,25	3,89	99,8	101,5	83,5	85,7	1,5	6,3	53,3	67,8				
		liq ut	6,5	5,64	147,6	147,5	177	189	<0,2	<0,2	54	63,2	Négatif	Négatif	Négatif	Positif
2576	0	sérum	4,56	4,52	97,9	99,6	87,1	121	1,5	9,7	60,6	78,9				
		liq ut	6,5	6,45	148,2	147,9	189	164	<0,2	<0,2	57,3	69,7	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
2390	1	sérum	4,39	4,3	101,3	101,4	61,9	23,7	0,3	5,8	69,3	76,7				
		liq ut	6,5	6,45	147,8	148,5	192	188	<0,2	<0,2	70,9	81,4	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
5302	1	sérum	4,27	4,34	92,2	98,9	36,9	70,2	1,5	13	71,5	82,4				
		liq ut	6,5	6,49	149,1	148,7	185	202	<0,2	<0,2	69,3	80,28	Négatif	Négatif	Positif	Négatif
798	16	sérum	4,4	4,24	100,4	101,2	50,2	69,6	2,5	12,6	45,1	58,2				
		liq ut	6,4	6,43	147,9	147,2	197	202	<0,2	<0,2	48,4	68	Négatif	Négatif	Négatif	Positif
1924	0	sérum	4,47	4,08	100,9	104,6	91,2	110	4,1	16,8	58,7	73,2				
		liq ut	6,4	6,52	147,9	148,7	189	176	<0,2	<0,2	60,5	72,5	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
2859	0	sérum	4,59	4,46	93,8	105,6	89,2	63,7	0,9	32,2	60,2	74,9				
		liq ut	6,5	6,45	148,7	148,7	189	186	<0,2	<0,2	58,8	70,9	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif

**Annexe III : Concentration d'IGF-1 du groupe II**

<b>Vaches</b>	<b>Compartiment</b>	<b>IGF-1 J7</b>	<b>IGF-1 JR</b>
2543	sérum	239,4	321,18
	liq ut	14,8	12,3
4303	sérum	116,2	282,8
	liq ut	10,3	12
1151	sérum	380,8	276,74
	liq ut	9,8	10,25
1709	sérum	306,3	99,99
	liq ut	19,3	25,42
185	sérum	234,3	153,52
	liq ut	12,3	12
3301	sérum	421,2	192,91
	liq ut	16,4	11,07
978	sérum	313,1	229,27
	liq ut	8,6	13,94
2994	sérum	181,8	224,22
	liq ut	9,8	6,56
2245	sérum	147,5	306,3
	liq ut	12,7	18,04
3500	sérum	157,6	510,05
	liq ut	10,7	18,04
8040	sérum	276,7	288,56
	liq ut	8,2	9,43
2500	sérum	78,8	163,62
	liq ut	7,4	7,38
2989	sérum	137,4	153,52
	liq ut	15,8	8,2
705	sérum	179,8	219,17
	liq ut	18,5	8,2
4866	sérum	264,6	139,38
	liq ut	9,0	10,25
5954	sérum	170,7	226,54
	liq ut	10,7	13,83
2300	sérum	212,1	133,32
	liq ut	20,5	12,3
116	sérum	261,6	163,62
	liq ut	9,8	9,84
2836	sérum	155,5	196,95
	liq ut	8,2	10,25
458	sérum	192,9	229,27
	liq ut	7,9	13,53